

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Thaís Alkifeles Costa

INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA VIRUS EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS DE 2017 A 2020 E ADAPTAÇÃO DE TESTE
DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL UTILIZANDO TECIDO HEPÁTICO

Belo Horizonte

2024

Thaís Alkifeles Costa

INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA VIRUS EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS DE 2017 A 2020 E ADAPTAÇÃO DE TESTE
DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL UTILIZANDO TECIDO HEPÁTICO

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

Orientadora: Betânia Paiva Drumond.

Belo Horizonte

2024

- 043 Costa, Thaís Alkifeles.
Investigação da infecção por chikungunya virus em primatas não humanos no estado de Minas Gerais de 2017 a 2020 e adaptação de teste de neutralização viral utilizando tecido hepático [manuscrito] / Thaís Alkifeles Costa. – 2024.
131 f. : il. ; 29,5 cm.
Orientadora: Profa. Dr^a. Betânia Paiva Drumond.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Primatas. 4. Testes de Neutralização. I. Drumond, Betânia Paiva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ATA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **THAIS ALKIFELES COSTA**

Nº REGISTRO: **2022660719**

Às 14:00 horas do dia **12 de abril de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Giliane de Souza Trindade (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Pedro Augusto Alves (Instituto René Rachou) e a Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Investigação da infecção por Chikungunya vírus em primatas não humanos no estado de Minas Gerais de 2017 a 2020 e adaptação de teste de neutralização viral utilizando tecido hepático**", da aluna **Thaís Alkifeles Costa**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 12 de abril de 2024

Membros da banca:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade
Dr. Pedro Augusto Alves

De acordo:

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond
(Orientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 16/04/2024, às 13:52, 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 16/04/2024, às 14:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Augusto Alves, Usuário Externo**, em 17/04/2024, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giliane de Souza Trindade, Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2024, às 12:51, 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 **3185973** e o código CRC **0E8741AD**.

Agradecimento

Agradeço ao programa de pós-graduação em Microbiologia da UFMG pela oportunidade de ter aprendido com tanta excelência.

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de vírus que tem tanto a ensinar e deixam a rotina laboratorial mais leve e humana. Destaque para Karolina, Anna Catarina e Walter que estão e sempre estarão juntos a mim. Aos professores do Laboratório de Vírus pela disponibilidade e por serem exemplos de profissionais.

Ao grupo ArboTeam que, unidos pela professora Betânia, caminha sempre se apoiando, trocando conhecimentos e tomando cafés. Destaque especial aos amigos Matheus e Gabriela que passaram pelo mestrado comigo, compartilhando ansiedades e alegrias na mesma proporção, e vão seguir comigo sempre.

À minha família que não mediu esforços para que eu pudesse estudar e seguir estudando, sempre sendo uma rede de apoio. Em especial ao Matheus pelo suporte em todos os aspectos e por mostrar que as coisas sempre dão certo, basta olhar do ângulo certo. À minha amiga/irmã Thamyres que agora acrescento na parte dos agradecimentos à família.

À Betânia, minha orientadora, por ser exemplo de profissional humana e competente, e por ter feito um ótimo trabalho de orientação desde 2017, na iniciação científica, até aqui, na defesa de mestrado.

Ao Centers for Research in Emerging Infectious Diseases (CREID), CREID Pilot Research Program, the Coordinating Research on Emerging Arboviral Threats Encompassing the Neotropics (CREATE-NEO), pelo financiamento do projeto (grants 1U01AI151378 e X.XXX.0217530). E também agradeço o apoio das agências de fomento Fapemig, CNPQ e CAPES (processos 88882.348380/2010-1 e 001).

Ao Laboratório de Zoonoses e ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte e à Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Às Pró-Reitorias de Pós-graduação e de Pesquisa/Universidade Federal de Minas Gerais/Brasil e à Universidade Federal de Minas Gerais.

Resumo

O chikungunya virus (CHIKV) é o agente causador da febre chikungunya (CHIKF). A introdução do vírus no Brasil ocorreu no ano de 2013 e um dos estados mais afetados por casos de CHIKF foi Minas Gerais, que em 2017 apresentou grande incidência da doença. No Brasil, o CHIKV é mantido na natureza em um ciclo urbano que envolve o *Aedes aegypti* e hospedeiros humanos. Na África é observado também o ciclo silvestre do vírus, que envolve mosquitos do gênero *Aedes* e os primatas não humanos (PNH) como hospedeiros. Ainda não foi descrita a circulação do CHIKV em ambientes silvestres no Brasil, porém existe o risco de estabelecimento, visto a persistência da circulação viral em centros urbanos e a presença de vetores competentes em ambientes periurbanos e rurais. Já foi descrita a detecção de anticorpos neutralizantes contra CHIKV em amostras de PNH do nordeste do país, indicando uma possível circulação desse vírus no hospedeiro silvestre. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é a investigação da circulação do CHIKV em PNH coletados no estado de Minas Gerais de 2017 a 2020 e a otimização de teste de neutralização adaptado utilizando amostra de tecido hepático. Para os testes moleculares, foi realizada a extração de RNA total de 407 amostras de fígado de PNH, que em seguida foram submetidas a RT-qPCR para detecção do controle endógeno. Feito isso, quando realizada a RT-qPCR tendo como alvo o gene E1 do CHIKV, as amostras testadas foram negativas. Para o teste de neutralização viral adaptado, foram utilizadas amostras de fígados de camundongos C57BL/6 previamente infectados com CHIKV (n=6) e de animais não infectados (*mock*) (n=6). Amostras do tecido hepático foram maceradas, clarificadas e o homogenato usado para a investigação de anticorpos neutralizantes. Quando comparados os resultados dos testes feitos com amostras de animais *mock* e animais experimentalmente infectados, foi observada diferença significativa entre as porcentagens de neutralização, indicando uma ação neutralizante anti-CHIKV em amostras de animais infectados. Após isso, foram realizados os testes de neutralização viral adaptado com homogenato de fígado de PNH coletados em Minas Gerais, em zona urbana, em 2017. Das 25 amostras testadas, uma apresentou neutralização acima de 90% (diluição 1:20), indicando a presença de anticorpos neutralizantes anti-CHIKV. A não detecção molecular do CHIKV e a detecção de anticorpos anti-CHIKV nas amostras de PNH ressalta a importância da vigilância epidemiológica e da utilização de outros métodos, como o sorológico, para uma investigação mais completa. Dadas as limitações das técnicas moleculares, o teste de neutralização adaptado pode contribuir para o melhor entendimento da circulação de CHIKV em animais silvestres, em Minas Gerais.

Palavras chaves: Chikungunya virus; primatas não humanos, *spillback*.

Abstract

The chikungunya virus (CHIKV) is the causative agent of chikungunya fever (CHIKF). The virus was introduced into Brazil in 2013 and one of the states most affected by cases of CHIKF was Minas Gerais, which had a high incidence of the disease in 2017. In Brazil, CHIKV is maintained in the wild in an urban cycle involving *Aedes aegypti* and human hosts. In Africa, in addition to the urban cycle, there is a wild cycle of the virus involving *Aedes* mosquitoes and non-human primates (NHP) as hosts. The circulation of CHIKV in wild environments in Brazil has not yet been described, but there is a risk of this cycle being established, given that viral circulation persists in urban centers and that there are competent vectors in peri-urban and rural environments. The detection of neutralizing antibodies against CHIKV in PNH samples from the northeast of the country has already been described, indicating a possible circulation of this virus in the wild host. Thus, the aim of this study is to investigate the circulation of CHIKV in NHP collected in the state of Minas Gerais from 2017 to 2020 and also to optimize an adapted neutralization test using liver tissue samples. For the molecular tests, total RNA was extracted from 407 liver samples from NHPs, which were then subjected to RT-qPCR to detect the endogenous control. Once this was done, when RT-qPCR was carried out targeting the CHIKV E1 gene, the samples tested were negative. Samples of liver tissue were macerated, clarified and the homogenate used to investigate neutralizing antibodies. When comparing the results of the tests carried out on samples from *mock* and experimentally infected animals, a significant difference was observed between the neutralization percentages, indicating anti-CHIKV neutralizing action in samples from infected animals. After this, adapted viral neutralization tests were carried out with liver homogenate from NHP collected in Minas Gerais, in urban areas, in 2017. Of the 25 samples tested, one showed neutralization above 90% (1:20 dilution), indicating the presence of neutralizing anti-CHIKV antibodies. The lack of molecular detection of CHIKV and the detection of anti-CHIKV antibodies in NHP samples highlights the importance of epidemiological surveillance and the use of other methods, such as serology, for a more complete investigation. Given the limitations of molecular techniques, the adapted neutralization test can contribute to a better understanding of the circulation of CHIKV in wild animals in Minas Gerais.

Keywords: Chikungunya virus; non human primates, spillback.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da partícula viral do CHIKV	16
Figura 2: Representação da organização do genoma do CHIKV	16
Figura 3: Representação do ciclo de multiplicação do CHIKV.	18
Figura 4: Países com registro de transmissão do CHIKV.	22
Figura 5: Incidência do CHIKV no Brasil do ano de 2013 a 2022.	23
Figura 6: Incidência do CHIKV no sudeste brasileiro, nos anos de 2015 a 2021.	24
Figura 7: Incidência de casos prováveis de CHIKF nos municípios do estado de Minas Gerais em 2017.	25
Figura 8: Esquema dos ciclos de transmissão do CHIKV.	27
Figura 9: Valores medianos de neutralização (%) dos testes com animais infectados com CHIKV e animais mock.	48
Figura 10: Análise da curva ROC com medianas de neutralização dos testes de neutralização adaptados utilizando homogenato de fígado de camundongos infectados e mock.	52
Figura 11: Análise da curva ROC com as menores medianas de neutralização dos testes de neutralização adaptados utilizando homogenato de fígado de camundongos infectados e mock.	54

Lista de tabelas

Tabela 1: PNH testados por RT-qPCR para detecção de RNA de CHIKV.	38
Tabela 2: Iniciadores e sonda utilizados nas RT-qPCR para detecção de B-actina e CHIKV em RNA extraído de fígado de PNH.	39
Tabela 3: Medianas de neutralização (%) obtidas nos três testes de neutralização contra CHIKV utilizando homogenato de fígado de animais experimentais.	47
Tabela 4: Resultado da análise GLMM da mediana de neutralização viral em relação aos grupos (infectado e mock), diluição e grupo/diluição.	50
Tabela 5: Valores máximos e mínimos neutralização (%) obtidos nos três testes de neutralização contra CHIKV utilizando homogenato de fígado de animais experimentais.	51
Tabela 6: Resultado da análise GLMM de resposta do valor mínimo absoluto de neutralização viral dos animais infectados e do valor máximo absoluto de neutralização viral dos animais mock para os grupos (infectado e mock), diluição e grupo/diluição.	51
Tabela 7: Análise da curva ROC das medianas de neutralização de animais infectados com CHIKV comparados com animais mock.	53
Tabela 8: Porcentagem de neutralização do teste de neutralização adaptado utilizando homogenato de fígado de PNH.	56
Tabela 9: Mediana de neutralização de teste neutralização com homogenato de PNH.	57

Lista de abreviaturas e símbolos

°C - graus célsius

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

CHIKF - febre da chikungunya

CHIKV - chikungunya virus

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREID - Centers for Research in Emerging Infectious Diseases

DENV - vírus da dengue

Dr. Doutor

Dra - Doutora

ECSA - *East-Central-South-African*

EEEV - vírus da encefalite equina venezuelana

ELISA - enzyme linked immuno sorbent assay

ER - retículo endoplasmático

FAMERP - Faculdade de medicina de são josé do rio preto

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FRNT - teste de neutralização por redução de focos

GLMM - modelo linear generalizado de efeito misto

HI - inibição de hemaglutinina

IFA - fluorescência indireta de anticorpos

ILHV - Ilhéus virus

IOL - *The indian ocean lineage*

LZOON - Laboratório de Zoonoses da prefeitura de Belo Horizonte

MAYV - mayaro virus

Me - Mestre

MEM - Meio essencial mínimo

ml - mililitro

mm - milímetro

MOI - multiplicidade de infecção

nm - nanômetro

ns - não estruturais

OMS - organização mundial da saúde

ORF - janela aberta de leitura

PCR - reação em cadeia da polimerase

PFU - unidades formadoras de placas

pH - potencial hidrogeniônico

PNH - primatas não humanos

PRNT - testes de neutralização de placas

RNA - ácido ribonucleico

ROC - receiver operating characteristic

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase antecedida por transcrição reversa.

SFB - soro fetal bovino

SLEV - vírus da encefalite de Saint Louis

SN50 - soroneutralização de 50%

SN90 - Soroneutralização de 90%

SNC - sistema nervoso central

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VEEV - vírus da encefalite equina venezuelana

WEEV - vírus da encefalite equina do oeste

YFV - yellow fever virus

ZIKV - vírus do Zika

µg - micrograma

µl - microlitro

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Ciclo de multiplicação do CHIKV	17
1.2 Febre chikungunya	18
1.3 Patogênese da febre chikungunya	20
1.4 CHIKV no mundo e introdução nas Américas e no Brasil	21
1.5 Ciclo de transmissão do CHIKV	26
1.6 Primatas não humanos e infecção por chikungunya virus	28
1.7 Testes de detecção do CHIKV	31
2. Justificativa	33
3. Objetivos	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. Materiais e métodos	36
4.1 Cultura de células e produção de estoque viral	36
4.2 Autorizações comitê de ética	36
4.3 Investigação molecular da infecção por CHIKV em carcaças de PNH	37
4.4 Teste de neutralização viral adaptado	40
4.4.1 Teste de neutralização viral adaptado usando amostras de animais experimentalmente infectados	40
4.4.2 Investigação sorológica da infecção por CHIKV em carcaças de PNH	43
5. Resultados e discussão	45
5.1 Investigação molecular de CHIKV em PNH	45
5.2 Otimização de teste de neutralização viral por redução de placa com tecido hepático de animais experimentalmente infectados	46
5.3 Teste de neutralização viral utilizando tecido hepático de carcaças de PNH	55
6. Conclusões	59

7.	Perspectivas	60
8.	Outras atividades no mestrado	61
9.	Referências	64
10	Anexos	74

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus (do inglês, *arthropod-borne viruses*) são vírus transmitidos por vetores artrópodes. Existem distintos grupos de vírus que possuem essa característica e muitos deles possuem alto potencial de emergência e reemergência, causando grandes surtos de doenças ao redor do mundo. As famílias virais *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Togaviridae* e *Flaviviridae* têm como alguns de seus integrantes arbovírus que estão envolvidos em diversos ciclos de transmissão, e que causam doenças em humanos e animais (CLETON *et al.*, 2012; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Dentre essas, a família *Togaviridae* abriga o gênero *Alphavirus*, que contém vírus transmitidos por mosquitos hematófagos e possuem ampla variedade de hospedeiros, como aves, peixes e mamíferos. Alguns dos alfavírus possuem grande importância médica e veterinária como o *Chikungunya virus* (vírus da chikungunya ou CHIKV), o *Eastern equine encephalitis virus* (vírus da encefalite equina oriental ou EEEV), o *Western equine encephalitis virus* (vírus da encefalite equina ocidental ou WEEV), o *Venezuelan equine encephalitis virus* (vírus da encefalite equina venezuelana ou VEEV) e o *Mayaro virus* (mayaro vírus ou MAYV) (GRIFFIN, 2013; ICTV, 2024). Os vírus do gênero *Alphavirus* podem causar exantema e artralgia e podem causar encefalite nos hospedeiros humanos e em animais (GRIFFIN, 2013).

O CHIKV é um vírus artritogênico causador da febre chikungunya (CHIKF). Sua partícula tem aproximadamente 70 nm de diâmetro e apresenta genoma de RNA, fita simples, senso positivo, de aproximadamente 11.800 bases (Figura 1). Seu genoma codifica uma poliproteína que é composta por quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que estão envolvidas na replicação viral. O genoma também codifica uma poliproteína que é composta por cinco proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) que fazem parte do capsídeo, envelope e que fazem parte também da partícula viral em processo de maturação (ZANOTTO; LEITE, 2018) (Figura 2). As proteínas E1 e E2 exercem importante papel na fusão de membranas e na penetração na célula por endocitose (VOSS *et al.*, 2010). Ainda a E1 e E2 são importantes por serem antigênicas e induzirem resposta imune em infecções naturais no hospedeiro (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2015).

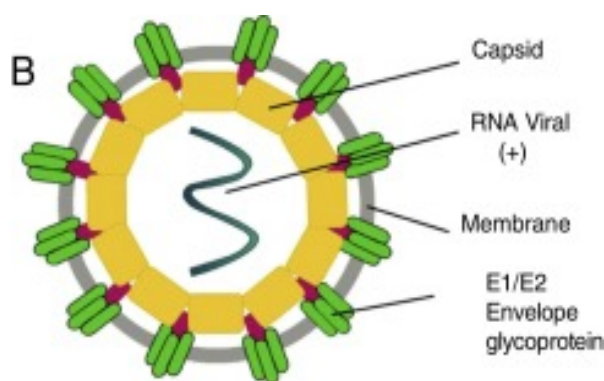


Figura 1: Representação esquemática da partícula viral do CHIKV. Estão representadas as estruturas do capsídeo, envelope e RNA viral de fita simples, polaridade positiva (CASTILLO-MACÍAS; SALINAS-CARMONA; TORRES-LÓPEZ, 2018).

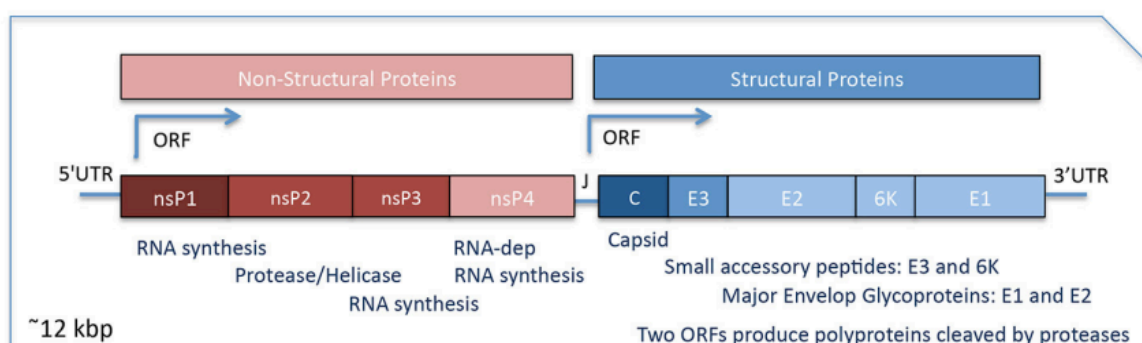


Figura 2: Representação da organização do genoma do CHIKV. Estão representadas a posição e função das proteínas virais estruturais que são a C (capsídeo), E3 e 6K (peptídeos acessórios) e E1 e E2 (envelope). As proteínas não estruturais são nsP1 e nsP3 (síntese de RNA), nsP2 (protease e helicase), e nsP4 (síntese e replicação de RNA). O CHIKV possui duas janelas abertas de leitura (*open reading frame* - ORF) que geram poliproteínas (ZANOTTO; LEITE, 2018).

O CHIKV possui um sorotipo e quatro genótipos (WEAVER, 2014) e a diferenciação dos genótipos é feita pela comparação de sequências genômicas do gene E1 (SIMON *et al.*, 2011). Os genótipos são o *East-Central-South-African* (ECSA) que foi identificado primeiramente no continente africano e tem registro de circulação na América do Sul e na Europa. O *West African*, que foi isolado no Senegal e na Nigéria, e é circulante na África. O *Asian* foi isolado do continente asiático, e atualmente circula também na América do Norte. Já o *The Indian Ocean lineage* (IOL) causou grande surto na Índia e na Ásia em 2004 e atualmente tem grande circulação na África, Europa e na Ásia (WEAVER e FORRESTER, 2015; WAHID *et al.*, 2017).

1.1 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO CHIKV

O ciclo de multiplicação do CHIKV se inicia com a adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira através da interação da proteína E2 do envelope com os receptores celulares. Após isso, o vírus é transportado para dentro da célula por endocitose mediada por clatrina, e, posteriormente, ocorre a redução do pH no interior da vesícula que leva à dissociação de proteínas E1 e E2. Essa mudança nas proteínas expõe o peptídeo de fusão da proteína E1 que é ancorada na membrana do endossomo, o que faz com que elas sejam fundidas e através da formação de poros o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma celular. Uma vez no citoplasma, o capsídeo é desnudado e, após essa etapa, o genoma viral pode começar a ser replicado (KUHN, 2013). Inicialmente, ocorre a tradução imediata de duas proteínas que são precursoras de proteínas não estruturais (poliproteína P1234 e P123), que ao final da clivagem produzem P123 e nsP4 e são importantes para a produção de fitas de genoma senso negativo intermediárias que são necessárias para a síntese de RNA genômico. O complexo de proteínas nsP1, P123 e nsP4 realiza a transcrição e replicação do RNA viral. Durante esse processo ocorre a tradução do RNA subgenômico que leva a síntese de poliproteína que é clivada e produz as proteínas C, 6K e E1. A poliproteína pE2 é transportada com a proteína E1 para o retículo endoplasmático e acessam o complexo de Golgi, formando um complexo pE2-E1. Esse complexo é transportado para a membrana plasmática celular, e, depois de mais clivagens, são originadas as proteínas E2 e E3 (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004). A montagem das partículas ocorre pela interação da proteína C, ribossomos e RNA viral que posteriormente se ligam às proteínas do envelope na membrana da célula, conduzindo o processo de brotamento do vírus (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004) (Figura 3). Após a liberação, os vírus adquirem uma bicamada lipídica derivada da membrana da célula (LEUNG *et al.*, 2011).

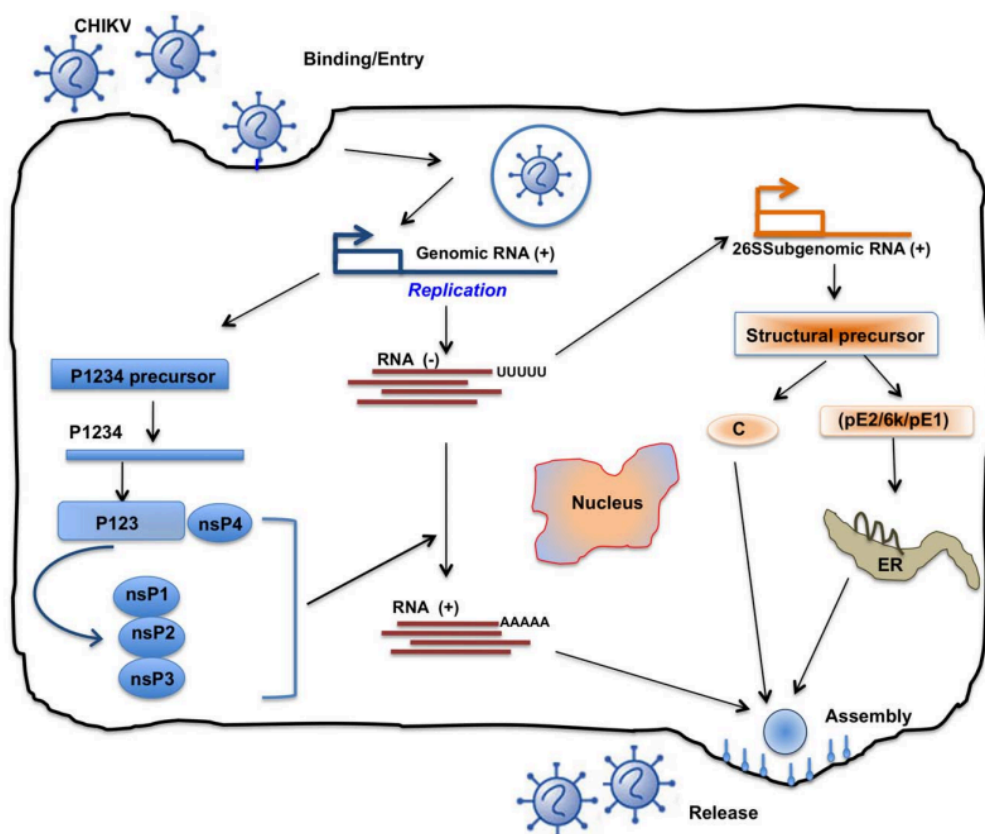


Figura 3: Representação do ciclo de multiplicação do CHIKV.

É representada a adsorção, penetração, desnudamento, replicação do material genético e produção de proteínas virais, montagem, maturação e liberação da partícula recém produzida. RNA: ácido ribonucleico. ER: retículo endoplasmático. (THIBOUTOT *et al.*, 2010).

1.2 FEBRE CHIKUNGUNYA

A CHIKF é caracterizada por uma febre aguda, dolorosa e é comumente confundida com a febre da dengue (SIMON *et al.*, 2011). Mas, diferente da dengue, os casos de infecção por CHIKV são majoritariamente sintomáticos (MATUSALI *et al.*, 2019). A fase aguda da doença se caracteriza por febre alta e artralgia na grande maioria dos pacientes (MATUSALI *et al.*, 2019), em conjunto com dor de cabeça, mialgia, hemorragia e irritação na pele. A infecção causada pelo CHIKV possui uma fase curta de viremia que persiste por quatro a sete dias após o início dos sintomas e a produção de anticorpos neutralizantes e específicos para o vírus acontece uma semana ou mais após o início da infecção (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A viremia da CHIKF é um preditor de casos graves da doença, visto que os casos que necessitam de hospitalização possuem maiores cargas genômicas virais quando comparados a casos sem complicações (WAGGONER *et al.*, 2016).

Diversos estudos já descreveram a persistência da artralgia por meses após a fase aguda da doença, sendo esse quadro de artralgia crônica mais comum em pessoas idosas e

com problemas de saúde pré-existentes como hipertensão, problemas cardíacos e renais (WAHID *et al.*, 2017). Estima-se que de 30 a 40% das pessoas que tem a CHIKF sofrem de sequelas persistentes como a artralgia e/ou a artrite e dos que apresentam artralgia, 37% sofrem de dor forte (MURILLO-ZAMORA *et al.*, 2017). Além do maior risco de desenvolver a forma grave da doença, o risco de morte por CHIKF também é maior em pessoas com problemas renais e cardíacos (DE MORAIS ALVES BARBOSA OLIVEIRA *et al.*, 2022). A artrite crônica pode incapacitar gravemente o indivíduo por semanas ou até anos (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015) causando prejuízo na qualidade de vida das pessoas e também significativos impactos na economia (MATUSALI *et al.*, 2019). Apesar da taxa de mortalidade por CHIKV ser baixa, já foram descritos óbitos em decorrência das formas graves da CHIKF principalmente no Nordeste do Brasil, o que chama a atenção para um possível aumento do número de casos graves da doença nessa região (DE LIMA *et al.*, 2021; VASCONCELOS; POWERS; HILLS, 2018).

Os sintomas da CHIKF, da febre do Zika e da dengue são difíceis de diferenciar, sendo necessários testes laboratoriais para a identificação do agente causador, e isso é agravado pela sobreposição dos locais de circulação do CHIKV, do dengue vírus (DENV) e zika vírus (ZIKV) (MATUSALI *et al.*, 2019; DE FRANÇA CIRILO *et al.*, 2023). Sendo assim, o grande número de casos associados a arboviroses em conjunto com a grande semelhança de sintomas e sinais clínicos entre elas gera confusão e falha na detecção da circulação dos arbovírus, fazendo com que a investigação com testes específicos seja necessária (DE SOUZA COSTA *et al.*, 2019). Somado a isso, existem estudos que mostram a possibilidade de reação cruzada entre MAYV e CHIKV e outros alfavírus, dificultando ainda mais o diagnóstico e investigação de circulação desses vírus (FUMAGALLI *et al.*, 2021), porém a diferenciação em testes sorológicos de anticorpos anti-alfavírus e anti-ortoflavivírus é possível (WILDER-SMITH *et al.*, 2017). O Ministério da Saúde considera um caso suspeito de CHIKF na presença de febre alta ($>38,5^{\circ}\text{C}$), artralgia e intensa artrite sem outros precedentes, além disso o indivíduo ter visitado ou viver em locais onde houve casos da doença. A confirmação da infecção por CHIKV é realizada através de sorologia, isolamento viral ou RT-PCR (RODRIGUES FARIA *et al.*, 2016). O contato com o CHIKV pode conferir imunidade por longos períodos com a produção de anticorpos neutralizantes, e isso pode evitar reinfecções nos indivíduos (SOUZA *et al.*, 2023).

Alguns estudos demonstraram o acometimento neurológico pelo CHIKV (WAHID *et al.*, 2017), sendo os mais comuns a encefalite e a encefalopatia. Essas complicações do sistema nervoso central (SNC) graves somam 0,1% dos casos de CHIKF. Além disso, foi

associado à infecção pelo CHIKV o desenvolvimento da síndrome de Guillain–Barré, antes já associada a infecções de diversos arbovírus (MATUSALI *et al.*, 2019).

Apesar de bilhões de pessoas viverem em áreas de risco para a transmissão de CHIKV, ainda não foram desenvolvidas vacinas ou antivirais para o tratamento ou prevenção da doença (POWERS, 2018). O tratamento vigente atualmente é caracterizado pelo uso de analgésicos e anti-inflamatórios, sendo que o uso de aspirina não é recomendado pelo risco de complicações hemorrágicas e de desenvolvimento de síndromes que acometem o SNC (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015). Alguns antivirais, como o Ribavirin, Favipiravir e Sofosbuvir estão sendo testados *in vitro* e *in vivo* e têm apresentado resultados positivos contra a infecção por CHIKV (MATUSALI *et al.*, 2019).

Estratégias como o uso de bactérias do gênero *Wolbachia* em mosquitos vetores têm demonstrado resultados satisfatórios na diminuição da incidência de infecções por CHIKV no Brasil (PINTO *et al.*, 2021). A medida preventiva mais eficaz para evitar a infecção por CHIKV e evitar surtos da doença é o controle do vetor, além de medidas de proteção individual que envolvem uso de repelentes e mosquiteiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, sd).

1.3 PATOGÊNESE DA FEBRE CHIKUNGUNYA

Após o repasto sanguíneo do mosquito vetor, o CHIKV tem acesso às células da pele (fibroblastos, queratinócitos e melanócitos), que é o primeiro sítio de replicação viral, onde o CHIKV é amplificado e atinge os linfonodos. Após a chegada nos linfonodos, o vírus se replica e já é capaz de atingir a corrente sanguínea do indivíduo, o que provoca alta viremia e permite que o vírus chegue a outros órgãos. Estudos já demonstraram que o CHIKV está presente em plaquetas e hemácias no sangue. Após a passagem para o sangue, além dos linfonodos, o CHIKV se replica no baço (MATUSALI *et al.*, 2019). Durante a fase aguda da doença o CHIKV atinge os músculos e as articulações, onde se replica e provoca os principais sintomas associados a doença, a mialgia e a artralgia. Além dos danos aos músculos e articulações, as cartilagens também são afetadas pela infecção apresentando um quadro de degradação e ocorre perda óssea em alguns casos pelo fato de que os osteoblastos também são sítios de replicação viral (GOUPIL *et al.*, 2016; NORET *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que os macrófagos são células que servem como sítio de replicação para o CHIKV e que estão associados com a persistência da infecção e os sintomas crônicos da doença (MATUSALI *et al.*, 2019).

Vários órgãos são afetados pela infecção do CHIKV, e isso está associado às complicações renais, cardiovasculares e hepáticas em alguns pacientes (RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010). Órgãos linfóides, fígado e células endoteliais apresentam altos títulos virais durante a infecção. A presença do CHIKV no fígado já foi descrita em estudos feitos em primatas não humanos (PNH) (MATUSALI *et al.*, 2019), em camundongos (COUDERC *et al.*, 2008) e também em biópsia de caso fatal de CHIKF em humano (CHUA *et al.*, 2010). Pulmões e rins também são órgãos onde o CHIKV está presente durante a infecção (MATUSALI *et al.*, 2019).

Apesar do CHIKV não ser considerado um vírus neurotrópico, casos de sintomas neurológicos associados à infecção por CHIKV já foram descritos e também de estudos que descrevem o isolamento viral e RT-PCR positiva em líquido de pacientes (MEHTA *et al.*, 2018). O CHIKV possui tropismo por vários tipos de células, isso pode ser explicado por suas proteínas se ligarem a um receptor (*virus entry-enhancing receptors* -PVEERs- mediados por proibirina, fosfatidilserina e glicosaminoglicanos) que é ubíquo entre os tipos celulares (VAN DUIJL-RICHTER *et al.*, 2015). Esse amplo tropismo celular do CHIKV é reforçado pelas várias formas de manifestação da doença durante a fase aguda e crônica (MATUSALI *et al.*, 2019).

1.4 CHIKV NO MUNDO E INTRODUÇÃO NAS AMÉRICAS E NO BRASIL

O CHIKV tem a distribuição geográfica caracterizada pela circulação na África, Ásia, América Central e América do Sul (MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018), e possui registro de transmissão em muitos países (Figura 4). A detecção de CHIKV mais antiga foi feita na Tanzânia, África, em 1952 em um surto de CHIKF que foi marcado por diversos casos de artralgia grave que persistiram por meses após a fase aguda da doença (MASON; HADDOW, 1957). Desde suas primeiras detecções, é observado o aumento de casos de infecção por CHIKV no continente africano (CHINEDU ENEH *et al.*, 2023). A recorrência de casos de infecção por CHIKV na África está associada ao ciclo enzoótico do vírus em hospedeiros silvestres, como os PNH, podendo ocorrer a infecção de humanos, por *spillover*, em áreas próximas de florestas (NITATPATTANA *et al.*, 2014). Entre os anos de 1960 e 1990, ocorreram alguns casos da doença em países da África Central e Meridional, Senegal, Guiné e Nigéria (POWERS; LOGUE, 2007). Em 2004, um surto de maior escala ocorreu em países como Quênia, Índia, China e outros países do Sudeste Asiático. Posteriormente, casos também foram reportados na Itália e na França, em 2007 e 2009, respectivamente. O surto de 2004 teve maiores proporções devido à uma mutação no gene que codifica a proteína E1 do

envelope, com a alteração do aminoácido 226, que permitiu a adaptação do vírus ao mosquito *Aedes albopictus*, que é um vetor do vírus para os humanos (POWERS; LOGUE, 2007; TSETSARKIN *et al.*, 2007).

Em dezembro de 2013, foi registrada a primeira detecção do CHIKV nas Américas, e em 2015 a circulação viral já era reportada em 42 países, incluindo Caribe, América Central, América do Norte e América do Sul que tiveram milhares de casos confirmados (Organização Mundial da Saúde, 2015). No Brasil, o primeiro caso autóctone de CHIKV ocorreu no Amapá, em 2014, seguido por casos confirmados no estado da Bahia. Os casos, nesses dois estados, tiveram origem de introduções diferentes no país, pois os vírus detectados nos dois estados são de genótipos diferentes, sendo eles os genótipos asiático (possivelmente vindo do Caribe e América do Sul) e ECSA (possivelmente vindo de Angola) (FILIPPE; PINTO, 1973; NUNES *et al.*, 2015). A transmissão sustentada do CHIKV após a sua introdução no Brasil, é resultado da abundância de população de hospedeiros susceptíveis, vetores competentes e também de condições climáticas favoráveis, como chuva e altas temperaturas (NUNES *et al.*, 2015).

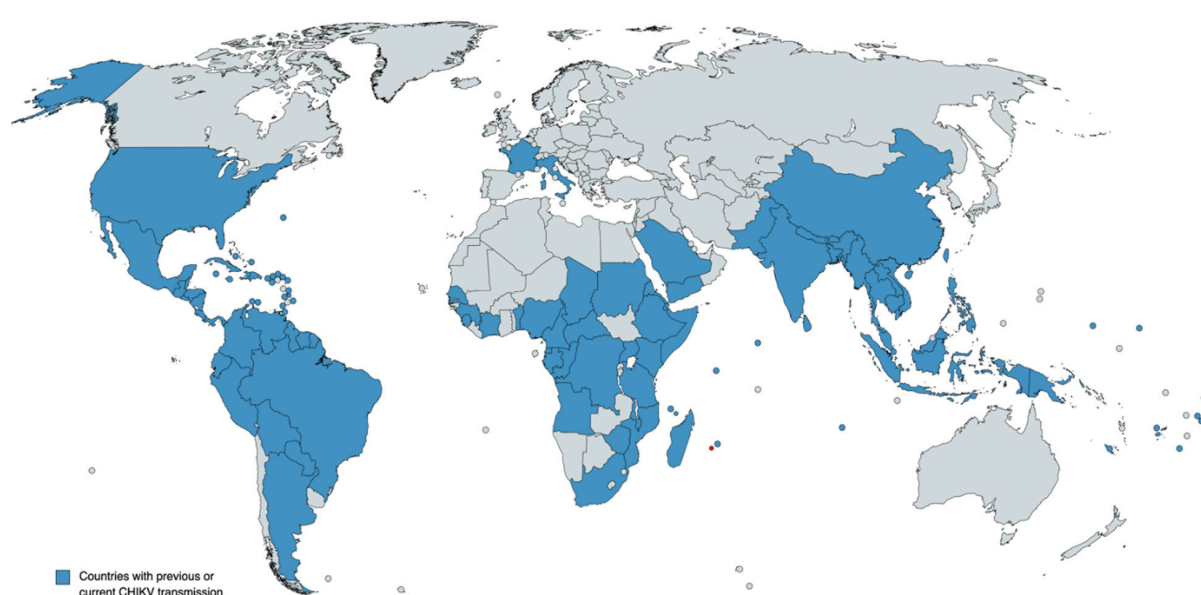


Figura 4: Países com registro de transmissão do CHIKV. Em azul estão representados países onde já foram registrados ou ainda são registrados casos de transmissão do CHIKV (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022).

Desde sua primeira detecção (1952) até 2018, o CHIKV já causou mais de 70 episódios epidêmicos ao redor do mundo (FRITSCH *et al.*, 2022; MATUSALI *et al.*, 2019).

No Brasil, dos anos de 2013 a 2015 foram confirmados aproximadamente 3000 casos de CHIKF, já dos anos de 2016 a 2017 houve um grande aumento no número de casos, sendo confirmados mais de 260 mil casos, sendo o Nordeste a região mais afetada do país (OMS, 2016; OMS, 2015; OMS, 2017). Nos anos de 2019 a fevereiro de 2022, foram reportados mais de 180 mil casos prováveis de CHIKF. No período de 2022 a 2023, houve significativo aumento no número de casos de infecção por CHIKV no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023), sendo o estado de Minas Gerais o mais afetado com mais de 100 mil casos prováveis notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Esses dados demonstram que a circulação do CHIKV continua acontecendo no Brasil, sendo a linhagem ECSA com circulação predominante no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; SOUZA *et al.*, 2023).

No Brasil, a somatória de casos confirmados e prováveis de CHIKF, desde a introdução da linhagem asiática e da ECSA em 2013 e 2014, faz com que o Brasil seja o país que tem o maior número de casos da doença na América (SOUZA *et al.*, 2023). Após anos da introdução do vírus no país, a circulação do CHIKV persiste em diversas regiões (Figura 5).

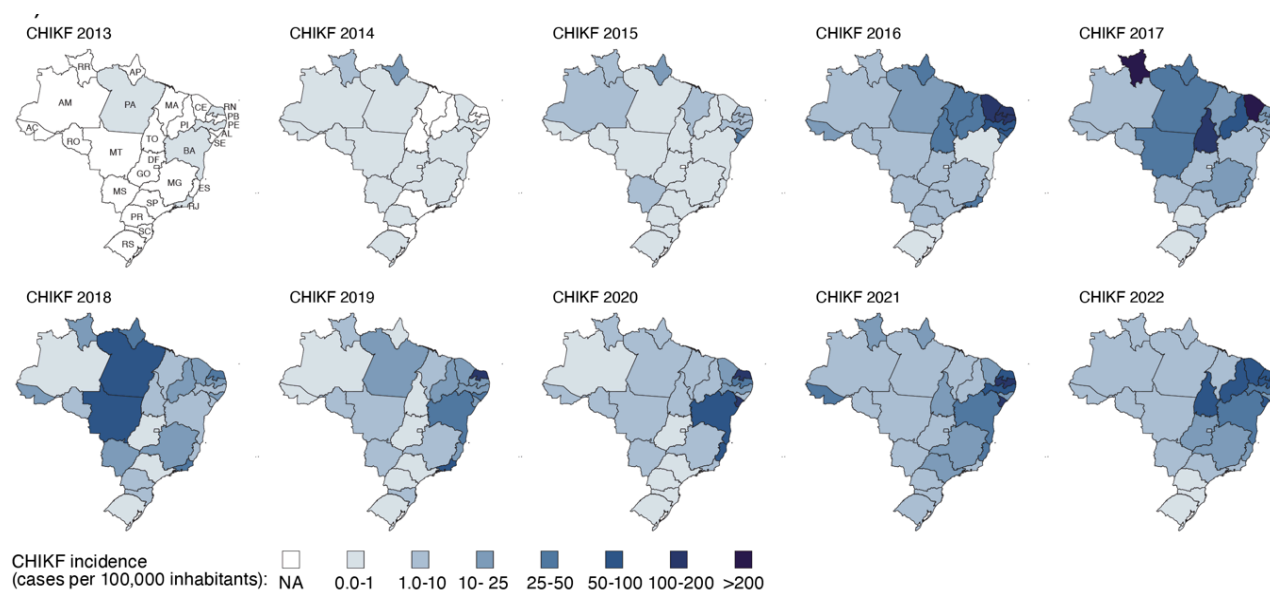


Figura 5: Incidência do CHIKV no Brasil do ano de 2013 a 2022. Representada na imagem a incidência do CHIKV nos estados brasileiros desde 2013, o ano da sua introdução, a 2022. A escala em tons de azul representa baixa incidência em branco e alta incidência em azul escuro. Incidência de casos por 100.000 habitantes (SOUZA *et al.*, 2023).

Os casos de CHIKF no Brasil ocorrem em surtos periódicos, predominantemente nos meses de fevereiro a julho (SOUZA *et al.*, 2023), o que é compatível com o padrão sazonal de algumas arboviroses, na maior parte do país. O padrão sazonal é caracterizado pela

ocorrência de casos principalmente nos meses de dezembro a maio, que têm clima úmido e quente, o que propicia a proliferação dos vetores e, consequentemente, leva a uma maior transmissão das arboviroses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). Mesmo que o CHIKV cause milhares de casos anuais no Brasil, seu manejo e políticas públicas dedicadas à vigilância e prevenção de casos são ainda uma lacuna e um desafio para a saúde pública do país (SEGATA, 2022).

Minas Gerais foi um dos estados atingidos pelo surto de CHIKF em 2017, e até 2023 tem registrado grande número de casos prováveis da doença, indicando uma persistência da circulação do vírus no estado (Figura 6)(FRITSCH *et al.*, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Após o início dos casos autóctones em 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), no ano de 2017 foram registrados mais de 16 mil casos prováveis de CHIKF no estado de Minas Gerais, superando o número de casos prováveis de dengue registrados no estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Os casos de CHIKF foram registrados em todas as mesorregiões do estado, porém houve maior número de casos e maior incidência registrada no Vale do Mucuri, Jequitinhonha e Vale do Rio Doce (Figura 7).

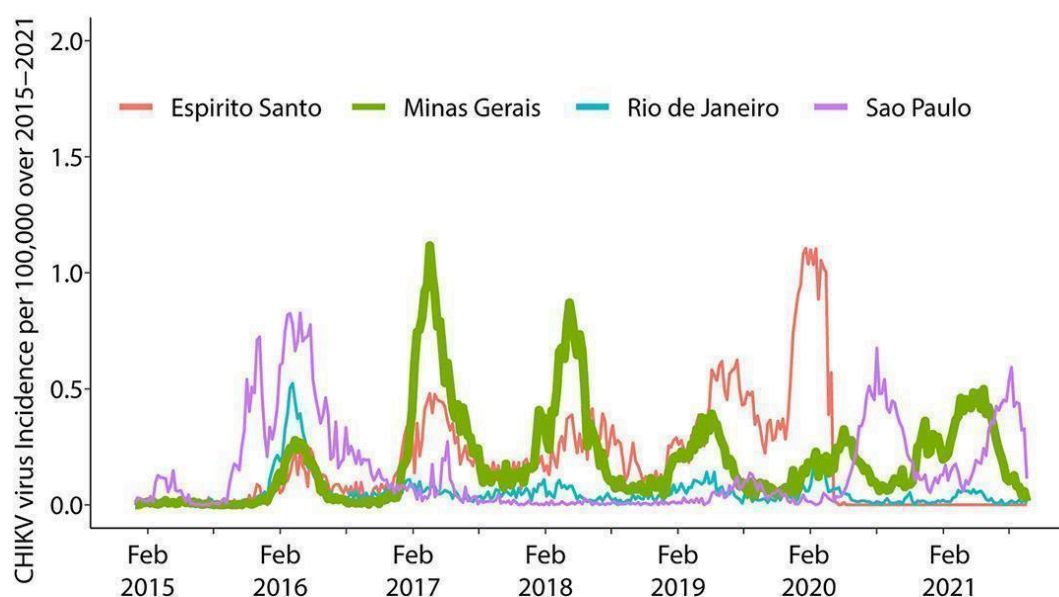


Figura 6: Incidência do CHIKV no sudeste brasileiro, nos anos de 2015 a 2021.

O Gráfico representa a incidência do CHIKV nos estados do sudeste do ano de 2015 a 2021. Em vermelho é representado o estado do Espírito Santo, em verde Minas Gerais, em azul o Rio de Janeiro e em roxo São Paulo. Incidência por 100.000 habitantes. Feb: Fevereiro (FRITSCH *et al.*, 2022).

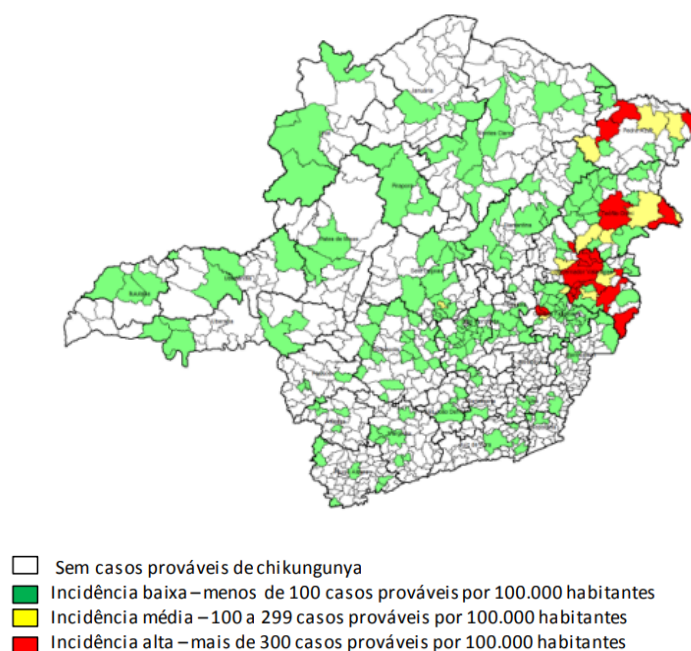


Figura 7: Incidência de casos prováveis de CHIKF nos municípios do estado de Minas Gerais em 2017. Mapa do estado de Minas Gerais em que municípios em branco representam a ausência de casos prováveis de febre chikungunya, em verde representam baixa incidência da doença, em amarelo representam média incidência e em vermelho representam locais com alta incidência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Concomitantemente com os surtos de CHIKF, entre 2016 e 2019, o Brasil enfrentou o maior surto de febre amarela já registrado que causou grande número de casos da doença em humanos, epizootias, e teve como consequência grande número de mortes humanas e de PNH (REZENDE *et al.*, 2018; SACCHETTO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020). Nesse período foram confirmados mais de 1900 casos de febre amarela em humanos, e mais de 1400 casos da doença em PNH, sendo a região Sudeste do país a mais afetada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). A co-circulação de arbovírus é um agravante para a vigilância e diagnóstico correto de doenças, principalmente pelo fato de apresentarem sintomas muitas vezes semelhantes. Dessa forma, o diagnóstico desses patógenos pode ser comprometido podendo mascarar e subnotificar a circulação de vírus de importância para a saúde pública (OIDTMAN; ESPAÑA; PERKINS, 2021). Um exemplo disso são o DENV, CHIKV e ZIKV que possuem áreas de circulação e vetores em comum e já foi descrita a co-circulação desses patógenos (MAGALHÃES *et al.*, 2017; RUFALCO-MOUTINHO *et al.*, 2021; RAUT *et al.*, 2015).

Em locais como o Brasil, onde existe a circulação de YFV, DENV, CHIKV, MAYV e ZIKV é de extrema importância a vigilância epidemiológica ser intensificada e também o uso de estratégias para diagnóstico diferencial para a notificação dos casos (SILVA *et al.*, 2018).

A co-circulação de arbovírus pode ocultar a presença e dificultar a detecção de vírus que podem permanecer circulantes silenciosamente (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Assim como já foi descrito na África a co-circulação de CHIKV e YFV (ENDALE *et al.*, 2020; OSTERRIETH; RATHE; DELEPLANQUE-LIEGEOIS, 1961), o CHIKV poderia ter circulado concomitantemente ao YFV durante o último surto de febre amarela no Brasil, visto que os humanos e PNH são hospedeiros de ambos os vírus. Somado a isso, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* do Brasil possuem competência vetorial para o CHIKV (VEGA-RÚA *et al.*, 2014). Outro fator que corrobora é que os alfavírus possuem ampla gama de vetores na África, o que indica que o vírus tenha facilidade de adaptação a novos vetores permitindo sua circulação no ambiente (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLOTI-NETO, 2019).

1.5 CICLO DE TRANSMISSÃO DO CHIKV

O CHIKV tem dois ciclos de transmissão descritos, o ciclo silvestre e o urbano (Figura 8). Na África, o CHIKV é circulante em um ciclo enzoótico silvestre que envolve mosquitos do gênero *Aedes* spp. como vetores PNH como principais reservatórios (DIALLO *et al.*, 1999; FILIPE; PINTO, 1973; NUNES *et al.*, 2015), além de aves e roedores (THIBOUTOT *et al.*, 2010). Além da transmissão do CHIKV por vetores, já foi descrita a transmissão vertical do vírus, da mãe para o feto (FIGUEIREDO, 2007).

Na África foram registrados diversos eventos de *spillover*, quando pessoas são infectadas em áreas silvestres ou rurais e se deslocam para centros urbanos, causando surtos da doença na população (SOUZA *et al.*, 2023). Na Ásia, a circulação do CHIKV ocorre em áreas urbanas envolvendo mosquitos vetores *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* e seres humanos como hospedeiros, mas existem indícios de circulação do vírus em ciclos silvestres após a detecção de anticorpos anti-CHIKV específicos em macacos selvagens em algumas partes do continente asiático (MORRISON, 2014).

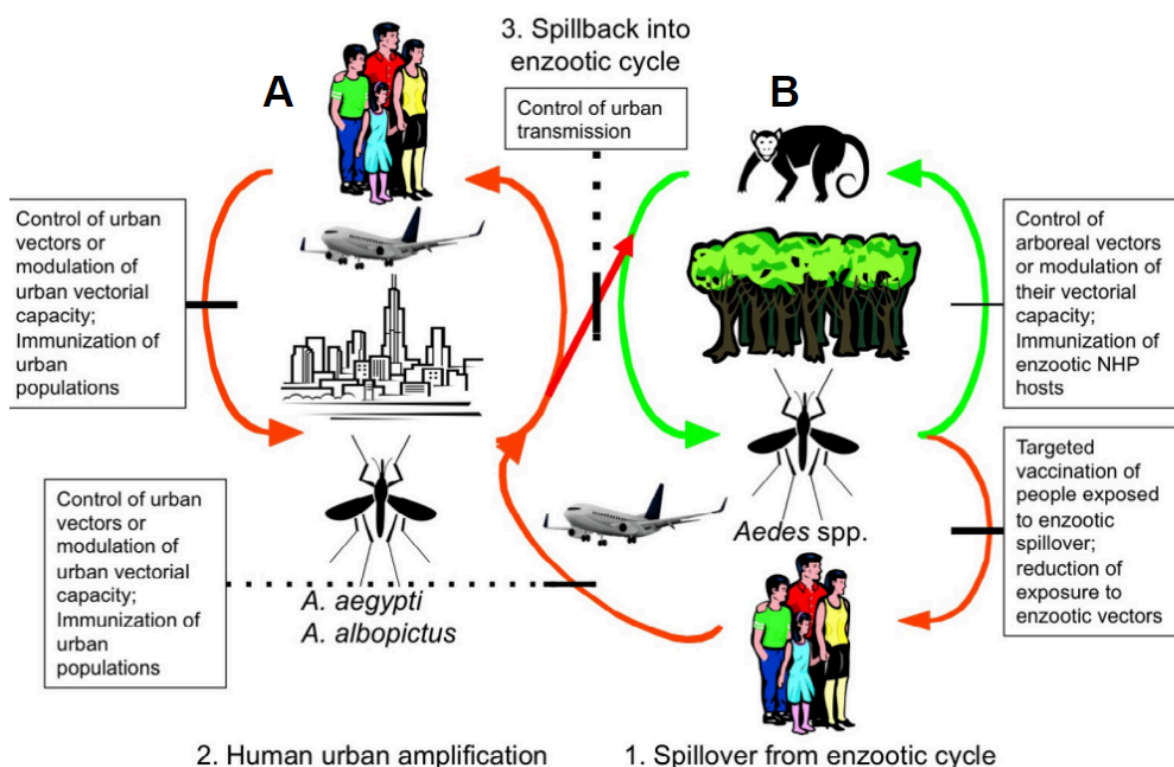


Figura 8: Esquema dos ciclos de transmissão do CHIKV.

Ciclo silvestre envolvendo mosquitos do gênero *Aedes* e PNH (A) e ciclo urbano envolvendo mosquitos do gênero *Aedes* e humanos (B). As setas indicam a circulação viral e a interconexão entre os dois ciclos de transmissão, destacando o spillover e spillback que pode ocorrer entre os dois ciclos virais (Weaver, 2013).

No Brasil, o CHIKV é transmitido para os humanos pelos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Grande parte da população brasileira sem imunidade para CHIKV vive em áreas onde *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus* estão presentes, o que propicia a infecção de pessoas pelo vírus (NUNES *et al.*, 2015). Ainda, não é sabido se o CHIKV tem um ciclo de manutenção silvestre estabelecido nas Américas. Até então, os casos reportados são de transmissão de mosquitos para humanos e de humanos para mosquitos. Porém existe o risco de um ciclo enzoótico se estabelecer, envolvendo PNH e mosquitos vetores do gênero *Aedes* no ambiente silvestre (INOUE *et al.*, 2003), assim como ocorre para outros vírus no país, como o yellow fever virus (YFV) (SACCHETTO *et al.*, 2020).

Em áreas densamente povoadas, a transmissão urbana do CHIKV provoca grandes surtos, pois a circulação viral mínima já é capaz de manter o vírus circulante na população (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022), em grande parte devido à população desprovida de contato prévio e, consequentemente, de anticorpos contra o CHIKV (MORRISON, 2014). Após o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, o CHIKV se multiplica no intestino do mosquito e se dissemina para outros tecidos, como as glândulas salivares. Estudos

experimentais demonstraram que, de dois a três dias após o repasto sanguíneo, o CHIKV já é encontrado na saliva do vetor, que pode continuar transmitindo o CHIKV por toda sua vida (CHINEDU ENEH *et al.*, 2023; DUBRULLE *et al.*, 2009; CAGLIOTI *et al.*, 2013). Sendo assim, o CHIKV é disseminado na população susceptível. Os fatores de risco para a ocorrência da febre chikungunya são a densidade populacional, migração, presença do vetor, temperatura, chuva e vegetação (YACTAYO *et al.*, 2016). Outros fatores de risco que podem ser citados são a abundância de vetores do CHIKV, a co-circulação com outros arbovírus e o grande número de casos assintomáticos da doença que dificultam o manejo dos pacientes e a identificação de surtos (HONÓRIO *et al.*, 2015).

Foi demonstrada a competência vetorial para a transmissão do CHIKV para diversas espécies do gênero *Aedes* em diversos países (MATUSALI *et al.*, 2019). No Brasil, espécies do gênero *Haemagogus* tiveram sua competência vetorial experimentalmente comprovada (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA e FAILLOUX, 2017). Em alguns estudos foi possível a detecção de RNA do CHIKV em mosquitos das espécies *Ae. taeniorhynchus* e *Cx. quinquefasciatus* coletados em locais onde foi registrada a circulação viral no sudeste, centro oeste e nordeste do Brasil (KROKOVSKY *et al.*, 2022; RIBEIRO CRUZ *et al.*, 2020; DE MELO XIMENES *et al.*, 2020; DA SILVA NEVES *et al.*, 2022). Além disso, também já foi descrita a detecção do RNA do CHIKV em mosquitos das espécies *Aedes fluviatilis* e *Wyeomyia bourrouli* coletados em parques urbanos do nordeste do Brasil (DE MELO XIMENES *et al.*, 2020), e também em espécies do gênero *Psorophora* no centro oeste do país (DA SILVA NEVES *et al.*, 2022). Esses estudos destacam o risco do estabelecimento de ciclos enzoóticos do CHIKV no país.

1.6 PRIMATAS NÃO HUMANOS E INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA VIRUS

Os PNH são importantes hospedeiros para diversos arbovírus (MATUSALI *et al.*, 2019). Estudos realizados na África demonstraram a participação dos PNH no ciclo silvestre do CHIKV (ALTHOUSE *et al.*, 2018; EASTWOOD *et al.*, 2017), nas Américas e na Europa a persistência da circulação do CHIKV precisa ser melhor compreendida.

Os PNH do Brasil são chamados Neotropicais ou do Novo Mundo, sendo eles das famílias Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae. Essas famílias têm comportamentos majoritariamente arborícolas e são ativos durante o dia, apresentando diversidade quanto ao tamanho, peso e comportamento. São descritas 130 espécies de PNH no Brasil com distribuição por todos os seis biomas brasileiros (PAGLIA *et al.*, 2012). No

Cerrado e na Mata Atlântica brasileiro, biomas característicos do estado de Minas Gerais, se encontram primatas do gênero *Alouatta* (bugios) que são reconhecidos pela sua vocalização característica (PAGLIA *et al.*, 2012), do gênero *Callithrix* (saguís-de-tufo ou mico estrela) que são pequenos, possuem unhas em formato de garras e são presentes em áreas de mata próximas à humanos e, por fim, primatas do gênero *Sapajus* (macacos-prego-de-topete) que vivem em grupo e são arbóreos (DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016; PAGLIA *et al.*, 2012). Esses animais, na maioria das vezes, são encontrados em ambiente silvestre, porém alguns grupos, como as famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae, possuem alta capacidade de sobreviver e viver em ambientes urbanos o que faz com sejam objetos importantes da vigilância da circulação viral (KUNO *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2012)

Os PNH são evolutivamente próximos do ser humano, dessa forma existe a chance de ocorrer *spillover* e *spillback* de patógenos que infectam ambos os grupos devido às semelhanças fisiológicas entre eles (WOLFE *et al.*, 1998). A presença dos mosquitos vetores e dos PNH em áreas de mata próximas às áreas urbanas oferece risco de *spillover* de vírus circulantes nesses ambientes, causando surtos de doenças em populações humanas. Essa situação pode ser exemplificada pelo YFV que circula em ambientes silvestres e eventualmente causa surtos em populações humanas. Com isso, é necessária a intensificação da vigilância da circulação de arbovírus em mosquitos e animais silvestres (MAGALHAES *et al.*, 2020). O Brasil possui programa de vigilância da circulação de YFV em carcaças de PNH de zonas rurais, urbanas e periurbanas (Ministério da Saúde, 2014), sendo assim possível incluir a investigação da presença de outros arbovírus, como o CHIKV.

Considerando que o CHIKV tem uma circulação silvestre na África que envolve PNH e mosquitos vetores do gênero *Aedes*, é prudente considerar que existe um risco do estabelecimento do ciclo silvestre do CHIKV no Brasil. Caso esse ciclo seja estabelecido, a erradicação da doença se tornaria muito dificultada no país (DONALISIO; FREITAS, 2015)

A infecção do CHIKV em PNH não se apresenta com sinais clínicos marcantes (MONGKOL *et al.*, 2022). Dessa forma, são necessários mais estudos para elucidar a infecção pelo CHIKV nos PNH e também em outros hospedeiros como roedores e aves (YACTAYO *et al.*, 2016). Em infecções experimentais em PNH da espécie *Macaca fascicularis* foi possível observar a fase aguda e crônica da doença. Os sintomas observados foram parecidos com os já descritos em humanos (HIGGS; ZIEGLER, 2010). Na fase aguda foi observado febre e exantema, e a viremia se apresentou mais alta do que a observada em humanos, com carga genômica variando de 10^8 a 10^9 cópias de RNA/mL (LABADIE *et al.*, 2010). É descrito que a viremia tem duração de dois a seis dias e tem início de dois a quatro

dias após a infecção (BINN et al. 1967). Aumento de aminotransferases e alterações no sangue foram observadas, como granulocitose, monocitopenia e linfopenia. Na fase crônica houve a persistência viral em macrófagos, tecido linfoide e fígado por até dois meses (LABADIE et al., 2010). Em estudos realizados em infecção experimental em macaco rhesus foi observada a detecção do CHIKV no sétimo dia após a infecção nas articulações, tecidos musculares, coração, pulmão, fígado, rim e tecidos linfoides (PAL et al., 2014).

Alguns trabalhos já demonstraram a detecção de anticorpos anti CHIKV e outros arbovírus em PNH na África, na Ásia e na América (MONGKOL et al., 2022). Foram detectadas evidências sorológicas de circulação do DENV, CHIKV e do Vírus da encefalite japonesa em PNH das Filipinas (INOUE et al., 2003) e a detecção de anticorpos anti-CHIKV em PNH da região sul da África, onde o ciclo silvestre do vírus é estabelecido (EASTWOOD et al., 2017; MCINTOSH, 1970). Outro estudo realizado no Senegal demonstrou a detecção de anticorpos específicos para CHIKV em PNH, por teste de neutralização de placas (*plaque reduction neutralization test* - PRNT), e demonstrou que existe a manutenção do vírus em ciclos enzoóticos que envolvem os PNH e mosquitos vetores, aumentando o risco da emergência da doença em humanos (ALTHOUSE et al., 2018). Na Ásia também já houve a detecção de anticorpos anti CHIKV em PNH (MARCHETTE et al., 1978; NAKGOI et al., 2014; SAM et al., 2015; TONGTHAINAN et al., 2020) e também o isolamento viral em amostras de PNH (APANDI et al., 2009). Nas Américas a detecção de anticorpos anti-CHIKV em amostra de PNH aconteceu nos Estados Unidos (HARRISON et al., 1967) e no Brasil (MOREIRA-SOTO et al., 2018).

No Brasil já foi descrita a detecção de anticorpos anti flavivírus em PNH do nordeste do Brasil. Em testes de PRNT realizados foi possível a detecção de anticorpos contra ZIKV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, ILHV e SLEV em PNH de vida livre e de cativeiro (DE OLIVEIRA-FILHO et al., 2018). Também foi descrita a detecção de anticorpos contra *Orthoflavivirus*, *Phlebovirus*, *Ortobunyavirus* e *Alphavirus* em PNH também da região nordeste do país (CATENACCI et al., 2018). Em outro trabalho, foram testadas, por PRNT, amostras de soro de PNH, coletados em áreas urbanas e periurbanas em que houve grande casos de detecção de YFV e CHIKV em humanos. Foram detectados anticorpos anti-CHIKV e anti-ZIKV em animais das famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae. Nos testes realizados, 11 PNH coletados nos anos de 2013, 2014 e 2016 foram positivos para a detecção de anticorpos neutralizantes contra CHIKV. Os animais tinham origem dos estados da Bahia e Pernambuco (MOREIRA-SOTO et al., 2018).

1.7 TESTES DE DETECÇÃO DO CHIKV

A infecção por CHIKV é diagnosticada a partir dos sintomas do indivíduo, levando em consideração critérios epidemiológicos. Os testes laboratoriais utilizados para detecção são os sorológicos, a RT-qPCR e o isolamento viral. É recomendada a RT-qPCR em amostras coletadas na primeira semana de sintomas, isso devido a curta viremia do vírus no sangue (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b). O isolamento viral também é uma alternativa, porém são necessários animais experimentais ou cultura de células, além de laboratório equipados, sendo necessária a confirmação da presença do vírus por RT-qPCR ou teste para a presença de antígenos virais. Para os testes sorológicos geralmente é necessário amostra de sangue do indivíduo que pode ser da fase de convalescença, até 14 dias após os sintomas. Os testes sorológicos mais utilizados são o ensaio imunoenzimático (do inglês *enzyme linked immuno sorbent assay* - ELISA) e os testes imunocromatográficos que podem detectar IgM ou IgG após a infecção por CHIKV, porém existe o risco de ocorrer reação cruzada com anticorpos de infecções por outros alfavírus. Alguns testes alternativos podem ser utilizados, como o de inibição de hemaglutinina (HI), teste de neutralização por redução de focos (FRNT) e fluorescência indireta de anticorpos (IFA) (AZAMI *et al.*, 2016).

O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) também pode ser utilizado e se apresenta testes padrão-ouro por ter alta especificidade e sensibilidade (ROEHRIG, 2008), pois detecta e quantifica anticorpos neutralizantes específicos em amostras de soro. Além de detectar infecção prévia para o vírus, a PRNT permite avaliar o nível de proteção por anticorpos do indivíduo, levando em consideração a neutralização viral do teste (AZAMI *et al.*, 2016).

Como a viremia do CHIKV em PNH é relativamente curta, as chances de detecção da circulação viral por RT-qPCR, quando são testadas amostras de carcaças de PNH, são baixas. Além disso, a detecção por PCR é influenciada por uma série de fatores, sendo um deles o estado de conservação da carcaça de PNH no momento da coleta do órgão. Dessa forma, os testes sorológicos para vigilância epidemiológica em PNH são de grande importância e são essenciais para investigar a ocorrência do ciclo silvestre do vírus no país (MONGKOL *et al.*, 2022). Porém, tendo como base a vigilância epidemiológica de YFV em PNH no estado de Minas Gerais, são coletadas as carcaças do animal, não sendo possível a coleta do sangue para realização dos testes sorológicos convencionais, como a PRNT, por exemplo. Dessa forma, são necessárias novas alternativas para que a investigação da infecção de PNH por

CHIKV seja melhor explorada, visto que a utilização apenas da abordagem de RT-qPCR seja limitada.

Vem sendo desenvolvido pelo grupo um teste adaptado de neutralização viral, baseado na PRNT convencional, para investigar a presença de exposição prévia dos PNH ao CHIKV. Na execução da PRNT convencional são utilizadas amostras de soro, enquanto que no teste adaptado de neutralização viral são utilizadas amostras de tecido hepático macerado, já que a coleta de soro das carcaças frequentemente não é possível. Dra. Natália da Silva realizou testes de neutralização ao YFV, utilizando tecido hepático macerado de carcaças de PNH, sendo observada uma redução de placas de lise. Com base nesse teste preliminar, foram produzidos macerados de fígado de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados para realização de ensaio de citotoxicidade que foram realizados pelo Dr. Erik Reis. Após a interpretação do resultado foi observado que a viabilidade celular quando utilizada a diluição de 1:20 foi superior a 80%, sendo observado o aumento da viabilidade à medida que a diluição também aumentava. Esses resultados demonstraram que é viável o uso de macerado de tecido hepático sem o prejuízo da monocamada de células Vero.

Com isso, o Me. Matheus Soares Arruda e a Me. Gabriela Fernanda Garcia Oliveira realizaram testes de neutralização adaptados com homogenato de fígado de camundongos experimentalmente infectados com MAYV e YFV (ARRUDA, 2023; OLIVEIRA, 2023). Nos testes foi possível observar a ação neutralizante do homogenato, associada com a presença de anticorpos neutralizantes, nas amostras dos animais infectados para esses vírus. Após as análises dos resultados foi possível a adaptação de teste de neutralização utilizando esse tipo de amostra, o que pode contribuir satisfatoriamente para os programas de vigilância de circulação viral em PNH.

2. JUSTIFICATIVA

O CHIKV é o agente causador da CHIKF que acomete milhares de pessoas todos os anos no Brasil. Desde sua introdução nos anos de 2013 e 2014, tem se registrado a persistência da circulação viral em diversas regiões do país. Essa circulação ocorre pelo ciclo urbano de transmissão, envolvendo os humanos como hospedeiros e como vetor o mosquito *Aedes aegypti*, amplamente distribuído no país. Na África o ciclo silvestre, que envolve PNH e mosquitos silvestres do gênero *Aedes*, é bem estabelecido, e isso destaca que existe risco do CHIKV se estabelecer em um ciclo enzoótico silvestre no Brasil, dificultando ainda mais sua erradicação. Esse risco é acentuado pelo fato de o *Aedes albopictus*, que habita áreas periurbanas no país, ser um vetor do CHIKV e de mosquitos do gênero *Haemagogus*, com hábitos silvestres, também presentes no Brasil, possuírem competência vetorial para o vírus.

O CHIKV tem registro de circulação em áreas em que também é registrada a circulação de outros arbovírus, o que dificulta a detecção e identificação correta dos patógenos, podendo mascarar a circulação e diagnóstico de alguns deles principalmente durante grandes surtos de doenças. Em 2017, o estado de Minas Gerais teve grande incidência de CHIKV, sendo registrados grandes números de casos da doença. Dessa forma, existe a possibilidade de PNH terem sido infectados pelo CHIKV durante a circulação do vírus no estado, por *spillback*. Levando em consideração que aconteceu em Minas Gerais um surto de YFV em 2017 que atingiu grande número de PNH, existe a possibilidade de que o YFV e o CHIKV possam ter co-circulado nesse período nos animais do estado.

Já foi descrita a detecção de anticorpos neutralizantes contra CHIKV em PNH no Brasil, o que é um indício da circulação do vírus nesses hospedeiros. Dessa forma, a intensificação e a ampliação da vigilância epidemiológica em PNH, que já acontece para o YFV, são importantes para que seja investigada a circulação de outros arbovírus e para que seja detectado o estabelecimento do ciclo silvestre de CHIKV, caso ele ocorra no Brasil.

O objetivo deste trabalho é a investigação da circulação do CHIKV em PNH de Minas Gerais coletados de 2017 a 2020, mesmo período em que observamos um grande número de casos de CHIKF no estado. Além disso, esse trabalho tem como objetivo a padronização de um teste de neutralização viral, utilizando tecido hepático de camundongos infectados com CHIKV, como uma alternativa para a detecção sorológica do vírus. A investigação da circulação do CHIKV em PNH, tanto molecular quanto sorológica, pode contribuir para preencher uma lacuna no conhecimento acerca da dinâmica de circulação do vírus. Além disso, a padronização de teste sorológico utilizando tecido hepático é uma alternativa de

auxílio à vigilância epidemiológica, uma vez que nem sempre é possível a coleta de amostras de soro, principalmente quando se trata de carcaças de PNH. Dessa forma, a detecção de anticorpos anti-CHIKV utilizando o tecido hepático, juntamente com a detecção molecular, pode ajudar a definir melhor as áreas de risco de *spillback*, onde medidas para a proteção da população podem ser tomadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a circulação do CHIKV em PNH coletados no estado de Minas Gerais, nos anos de 2017 a 2020, e otimizar teste de neutralização viral utilizando tecido hepático para investigação sorológica de CHIKV.

3.2 Objetivos específicos

Investigação da presença de RNA de CHIKV, por meio de RT-qPCR, em amostras de fígado de carcaças de PNH coletadas em Minas Gerais, nos anos de 2017 a 2020.

Adaptação e otimização de ensaio de neutralização viral utilizando tecido hepático de camundongos experimentalmente infectados com CHIKV.

Realização de teste de neutralização viral adaptado utilizando tecido hepático de fígado de PNH coletados em zona urbana de Minas Gerais, no ano de 2017.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células e produção de estoque viral

Foi utilizado o CHIKV da linhagem asiática (BHI1762H804917), gentilmente cedidas pelo Dr. Maurício Nogueira (FAMERP), como controle em experimentos de investigação molecular do CHIKV e investigação de anticorpos neutralizantes anti-CHIKV.

Células Vero (CCL81) foram utilizadas para a montagem das placas de célula, para a realização do teste de neutralização adaptado, para ensaio de titulação viral e para produção de estoques virais. As células Vero, que são derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram cultivadas em meio MEM (Cultilab, BR) suplementado com 100U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 2 µg/ml de anfotericina B e 5% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (ATCC).

Para a produção de vírus, monocamadas de células Vero foram infectadas com MOI de 0,01. Após o tempo de incubação *overnight*, o sobrenadante foi coletado, clarificado e aliquotado em tubos de 0,6ml (ANG; LAM; CHU, 2016). Após a produção o CHIKV foi titulado utilizando monocamadas de células VERO em placas de 6 poços. O sobrenadante viral foi diluído de forma seriada na base 10 até 10⁻⁷ e inoculado nos poços de células, seguido por adsorção de 1 hora, com agitação da placa a cada 10 minutos. A placa foi incubada por 48 horas e foi adicionado formalina 3,7% para fixação e incubação por 30 minutos e cristal violeta 1% para coloração com incubação de 30 minutos, seguido da lavagem (KAUR; LEE; CHU, 2016). Após a análise do resultado do experimento, o título viral calculado foi de 2,8x 10⁸. O título viral foi utilizado para os cálculos dos testes adaptados de neutralização viral.

4.2 Autorizações comitê de ética

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG para recebimento e armazenamento de amostras biológicas de PNH (Protocolo CEUA: 98/2017). A utilização de animais experimentais no projeto foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) e aprovada para utilização de animais em experimentação (protocolos CEUA: 33/2021; 176/2021), conforme a Lei 11.794/2008 e o Decreto 6.899/2009 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Investigação molecular da infecção por CHIKV em carcaças de PNH

As amostras de fígado de carcaças de PNH utilizadas nesse estudo foram obtidas em parceria com o Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON) e o Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As carcaças de PNH foram coletadas pelo LZOON, no estado de Minas Gerais, durante o surto de YFV que ocorreu no estado, possibilitando assim a construção de um banco de amostras que permitiu que a investigação de outros arbovírus fosse realizada posteriormente. Após o recebimento, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 mL com e sem *RNA later™ Stabilization Solution* em freezer -70°C no Laboratório de Vírus/UFMG. Para este projeto foram utilizadas amostras de fígado de 428 carcaças de PNH coletadas nos anos de 2017 a 2020 em áreas urbanas, periurbanas e rurais do estado de Minas Gerais. As carcaças testadas neste trabalho são distribuídas entre os gêneros *Callithrix*, *Callicebus*, *Alouatta* e *Sapajus* e da família Cebidae foram coletadas no período epidêmico e não epidêmico e são advindas das 12 mesorregiões do estado de Minas Gerais.

Para os testes moleculares das carcaças de PNH (tabela 1), foi realizada a extração de RNA total de 407 fígados de carcaças de PNH armazenados em freezer -70°C e embebidos em *RNA later™ Stabilization Solution*. As carcaças, advindas de áreas urbanas, rurais e periurbanas, pertencem a animais dos gêneros *Callithrix* (n=308), *Callicebus* (n=28), *Alouatta* (n=40), *Sapajus* (n=1) e a família Cebidae (n=3) sem identificação de gênero. Algumas carcaças não possuem informação de gênero ou família (n=27). Das carcaças utilizadas, 63% (n=258) apresentavam estado de conservação bom, 26% (n=109) intermediário e 5% (n=23) ruim. De 4% (n=17) delas não foi possível obter essa informação. Das 407 amostras, 268 (65%) foram positivas para detecção do RNA do YFV em investigações prévias no fígado (SACCHETTO et al. 2020).

Tabela 1: PNH testados por RT-qPCR para detecção de RNA de CHIKV

Área de procedência						
Ano	Espécie/gênero	Urbana	Rural	Periurbana	Sem informação	Total
2017	<i>Callithrix sp.</i>	129	81	23	2	235
	<i>Callicebus sp.</i>					
	<i>Alouatta sp.</i>					
	<i>Sapajus sp.</i>					
2018	<i>Callithrix sp.</i>	51	74	4	3	132
	<i>Callicebus sp.</i>					
	<i>Alouatta sp.</i>					
2019	<i>Callithrix sp.</i>	8	3	0	0	11
	<i>Callicebus sp.</i>					
	<i>Alouatta sp.</i>					
2020	<i>Callithrix sp.</i>	22	4	2	1	29
	<i>Callicebus sp.</i>					
	<i>Alouatta sp.</i>					
	TOTAL	210	162	29	6	407

Número de PNH testados por RT-qPCR, incluindo informações do ano de coleta, do gênero e/ou espécie e da classificação do local de coleta em rural, urbano ou periurbano. O valor total de animais testados PNH: primatas não humanos; CHIKV: vírus da chikungunya.

Para a investigação molecular, foi utilizado fragmento de 20 a 30 mg de tecido de cada amostra, que foram colocados em microtubos de 1,5mL juntamente com 600 µL de tampão de lise (Buffer RLT – QIAGEN, EUA) e três esferas de borossilicato de 2mm (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os tubos foram colocados em um macerador (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, EUA) onde as amostras foram maceradas. Após isso, o conteúdo dos tubos foi utilizado para realização da extração de RNA total com o protocolo *Purification of Total RNA from Animal Tissues*, RNeasy® Mini Handbook, 4th edition, 2012, seguindo recomendações do fabricante (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN, EUA). O RNA foi eluído em 65 µL de água livre de *RNase* e armazenado em freezer a -70°C. Na extração de ácidos nucleicos foi utilizado controle negativo, que consiste na realização do

processo sem a adição de amostra, de forma a garantir que não houvesse contaminação cruzada entre as amostras.

As 407 amostras de RNA total extraídas foram submetidas a *one step* PCR em tempo real (kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR - Promega, EUA) em StepOne™ RealTime PCR Systems (Applied Biosystems, EUA) e QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA). As amostras extraídas foram submetidas à RT-qPCR com iniciadores para detecção do gene constitutivo da proteína β -actina (tabela 2) (REZENDE *et al.*, 2019) como controle endógeno, garantindo que a extração do ácido nucleico funcionou, por ser altamente conservada e presente em amostras biológicas animais. Foi utilizado controle negativo contendo apenas água (*non-template control*) e o controle negativo da extração também foi testado. As 407 amostras testadas molecularmente nesse estudo foram submetidas à RT-qPCR tendo como alvo o controle endógeno e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram temperatura de melting (T_m) de $82^\circ\text{C} \pm 1$. Caso a amostra não cumprisse esse requisito, a RT-qPCR era repetida, e caso o resultado persistisse a extração de ácido nucleico era feita novamente.

Após serem positivas no teste do controle endógeno, as amostras foram submetidas à RT-qPCR para detecção do genoma de CHIKV utilizando iniciadores e sonda específicos descritos por Edwards e colaboradores (EDWARDS *et al.*, 2007)(tabela 2). Os iniciadores utilizados têm como alvo a proteína E1 do genoma do CHIKV, gerando um fragmento de aproximadamente 120 bases. As amostras foram testadas em duplicata, utilizando controle negativo contendo água, controle negativo da extração de RNA e controle positivo de CHIKV.

Tabela 2: Iniciadores e sonda utilizados nas RT-qPCR para detecção de B-actina e CHIKV em RNA extraído de fígado de PNH.

Iniciadores e sondas	Sequência	Alvo	Referência
β -ACT_FWD	5'- CCAACCGCGAGAAGATGA -3'	β -actina	De Rezende <i>et al.</i> , 2019
β -ACT_REV	5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'		
CHIK E1 F	5'- TCGACGCGCCCTCTTTAA -3'	Gene E1 CHIKV	Edwards <i>et al.</i> , 2007
CHIK E1 R	5'- ATCGAATGCACCGCACACT -3'		
CHIK E1 P	5'- ACCAGCCTGCACCCATTCTCAGAC -3'		

FWD: iniciador forward (senso); REV: iniciador reverse (antissenso); F: forward; R: antissenso; P: sonda; CHIKV: vírus da chikungunya. CHIKV E1 P: FAM-BHQ1a.

4.4 Teste de neutralização viral adaptado

Testes de neutralização viral foram inicialmente feitos com amostras de fígado de camundongos C57BL/6 previamente infectados com CHIKV e animais mock inoculados com sobrenadante de células Vero (MEM 5% SFB). Com os resultados obtidos foram realizados testes para a detecção de anticorpos anti-CHIKV por neutralização viral utilizando amostras de fígado de PNH.

4.4.1 Teste de neutralização viral adaptado usando amostras de animais experimentalmente infectados

Os testes de neutralização viral foram realizados utilizando amostras de fígado de camundongos C57BL/6. Seis camundongos foram infectados previamente com 1×10^6 unidades formadoras de placa (do inglês, *plaque forming units* - PFU) de CHIKV, enquanto outros seis animais foram inoculados com meio MEM 5% SFB sobrenadante de células Vero não infectadas (*mock*). Ambos os grupos foram inoculados por via intraplantar. Após a infecção dos animais, eles foram observados por 21 dias e eutanasiados, nesse processo os fígados foram coletados e armazenados em tubos de 1,5mL em freezer a -20°C . Outro grupo de animais foi infectado com 1×10^6 PFU de CHIKV para obtenção de soro sabidamente positivo para presença de anticorpos anti-CHIKV, para utilização como controle positivo nos testes de neutralização viral. A manutenção e infecção dos animais foi feita com a colaboração do Dr. Erik Reis.

Para a produção do homogenato de fígado foram utilizados 50 mg de fígado de camundongos C57BL/6 macerado em beadbeater (Mini-Beadbeater-24, BioSpec Products, EUA) com 200µL de MEM sem suplementação e quatro esferas (beads) de borosilicato de 2 mm (Sigma-Aldrich, Alemanha). Após a maceração, o homogenato foi centrifugado (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha) por cinco rodadas em velocidade máxima (13.200 rpm) por 10 minutos para a clarificação e o sobrenadante final, sem *debris* celulares, foi coletado. Com o homogenato obtido, foi realizada a diluição 1:10 utilizando 80 µL de amostra e 720 µL de MEM 0% SFB. Esse material foi então incubado a 56°C por 30 minutos para a inativação do sistema do complemento. Após a inativação, foi realizada mais uma etapa de clarificação da amostra, com centrifugação por três minutos em velocidade máxima (aproximadamente 16.000 g). Assim, aproximadamente 750 µL de sobrenadante na diluição 1:10 foram obtidos e usados em diluições seriadas de 1:20 a 1:640, usando MEM, em placa *deepwell* de 96 poços. Nessa etapa, foi utilizado MEM com 1% de SFB e 1% HEPES, assim como para o preparo do controle de vírus e de células. A utilização de solução tamponante

(HEPES) foi utilizada como uma tentativa de estabilizar o pH do meio e diminuir as variações nas contagens de PFU nos experimentos de ambos os grupos.

Para o preparo do controle de vírus, o meio foi misturado com a quantidade pré-estabelecida de vírus de modo que ao final foi possível a contagem de 70 a 180 PFU por poço da placa de células. Foi utilizado um controle positivo de neutralização, que consiste em amostra de soro de camundongos C57BL/6 infectados com CHIKV nas diluições 1:20 a 1:640 sendo possível observar a neutralização viral. Foi utilizado também um segundo controle positivo que consistia em uma mistura de soro de animal infectado com CHIKV e homogenato de animal não infectado, em igual proporção, com o objetivo de observar a neutralização por anticorpos no soro na presença do material do homogenato de fígado. Foi utilizado também controle negativo que consistia em homogenato de fígado de animal não infectado, de forma a observar a interferência desse material na redução de placas.

Após a diluição, a solução contendo vírus foi adicionada às amostras e controles na placa de 96 poços. Após a mistura, a placa foi incubada em estufa por uma hora a 37°C a 5% de CO₂ para possibilitar a ligação dos anticorpos às partículas virais (AZAMI *et al.*, 2016).

Foram utilizadas placas de células de 12 poços com $1,8 \times 10^5$ células por poço onde, após a incubação, foram inoculados 180µl da mistura da amostra e dos controles com o vírus. Em cada placa foram inoculados três poços (triplicatas) para cada amostra de homogenato de e para os controles positivos e negativo, dois poços (duplicata) para os controles de vírus e um poço para o controle de células. Após a inoculação, foi realizada a etapa de adsorção em que as placas de células infectadas foram incubadas em estufa por uma hora a 37°C a 5% de CO₂, sendo homogeneizadas manualmente a cada 10 minutos. Após o fim da adsorção, foi adicionado aos poços de célula solução de carboximetilcelulose a 1,5% e meio 199 2x (Gibco-Life Technologies, EUA) com 2% de SFB e as placas foram incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por dois dias e observadas diariamente em microscópio óptico.

Decorrido o tempo de incubação, as células foram fixadas com solução de formalina 3,7%, por duas horas, e coradas com solução de cristal violeta 1%, por 30 minutos. Após a lavagem do cristal violeta foi realizada a contagem de PFU em cada amostra e diluição realizada para a realização de análises posteriores.

Apenas foram consideradas válidas as contagens de PFU no controle de vírus que variaram entre 70 e 180 PFU. Apenas foram considerados experimentos cujos controles positivos e negativo funcionaram. O número de PFU por poço/diluição/animal (por poço, por diluição por animal) foi utilizado para o cálculo da porcentagem de neutralização com base no controle de vírus (mediana de PFU no controle de vírus de cada placa)

Foram realizados três testes feitos com homogenatos de seis animais infectados com CHIKV e três testes feitos com homogenatos de seis animais *mock*, todos realizados de maneira independente. Para as análises, foram consideradas e apresentadas nesse trabalho os resultados referentes às diluições 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160, pois em diluições maiores não foram observadas mudanças significativas entre os dois grupos. Neste estudo optou-se pela utilização da mediana que não permite que o conjunto de dados seja diretamente afetado por *outliers*, como a média pode ser afetada, isso considerando que o teste de neutralização viral possui variações inerentes à técnica (TIMIRYASOVA *et al.*, 2013).

De cada réplica experimental, foram calculados os valores de neutralização por poço, por animal por diluição (por poço/diluição/animal). Foi analisada a variação do valor de neutralização entre as triplicatas de cada animal/diluição, para que os resultados não tivessem grande influência de erros de técnica. Em seguida, de cada réplica experimental, foi calculado o valor mediano de neutralização para cada animal/diluição. Sendo assim, obtivemos três valores de medianas de porcentagem de neutralização para cada animal em cada diluição. Estes valores medianos de neutralização por animal/diluição (relativos às 3 réplicas experimentais para cada grupo, infectado ou *mock*) foram analisados (GLMM e ROC). Ainda, os valores mínimos absolutos de neutralização por diluição de cada animal infectado foram comparados com os valores máximos absolutos de neutralização, por diluição, de cada animal *mock* (GLMM).

Foi utilizado o modelo linear generalizado de efeito misto (*Generalized Linear Mixed Models* - GLMM) para analisar como os valores de neutralização de cada animal se comportam em relação ao grupo (infectado e *mock*), à diluição e à interação da diluição com o grupo. Optou-se pela utilização de teste com modelo misto pela característica do conjunto de dados utilizado, que possui diluições derivadas de um mesmo animal que vão ser analisadas entre si e também por assumir que os diferentes indivíduos têm respostas diferentes diante da infecção ou não com CHIKV. Com a colaboração da Dra. Marina Beirão, as análises foram realizadas no RStudio 4.2.3 (RSTUDIO TEAM, 2020; WICKHAM, 2016) com o lme4 (BATES *et al.*, 2015). Diferenças estatísticas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

Em uma primeira análise, foram utilizados como variáveis dependentes os três valores medianos de neutralização viral/animal/diluição das três réplicas experimentais (tabela 3), e como variáveis independentes o grupo (infectado ou *mock*), a diluição (1:20 a 1:160) e a interação do grupo com a diluição.

Em outra análise realizada, foram comparados o maior valor absoluto de neutralização/animal *mock*/diluição e o menor valor absoluto de neutralização/animal infectado/diluição (tabela 5). O objetivo dessa análise foi verificar se, mesmo com os maiores valores de redução de placas no grupo *mock* e os menores valores de neutralização no grupo infectado, ainda seria possível diferenciar os dois grupos.

Foram feitas também análises de curva ROC (*receiver operating characteristic*), que é utilizada para avaliar a performance de um teste diagnóstico, determinando um valor adequado de *cut off* para considerar um teste negativo ou positivo (NAHM, 2022). Para as análises foi utilizado o GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

Primeiramente, foi feita uma análise usando a mediana de neutralização de cada animal/diluição (considerando três réplicas experimentais) (tabela 3), utilizando o método Wilson/Brown (WILSON 1927; BROWN *et al.*, 2001). O objetivo desse teste foi observar se era possível diferenciar estatisticamente os grupos infectados e *mock* em cada diluição, e observar os *cut offs* de porcentagem de neutralização de cada diluição em relação a sensibilidade e a especificidade do teste. Foi feita também a análise da curva ROC, usando o menor valor mediano de neutralização/animal infectado/diluição e o maior valor mediano de neutralização/animal *mock*/diluição (tabela 3). O objetivo desta análise consistiu em investigar se mesmo utilizando as medianas mínimas do grupo infectado e máximas do grupo *mock* ainda seria possível a diferenciação dos dois grupos, visto que a técnica possui variações e pode sofrer interferência do tipo de amostra utilizada.

4.4.2 Investigação sorológica da infecção por CHIKV em carcaças de PNH

Após a realização dos testes utilizando tecido hepático de camundongos e a análise desses resultados, foram realizados alguns testes de neutralização adaptados com tecido hepático de carcaças de PNH. Foram utilizados fígados de 25 carcaças de PNH coletadas durante o surto de YFV, no ano de 2017, em zonas urbanas no estado de Minas Gerais. Todas as carcaças são do gênero *Callithrix* e eram provenientes das mesorregiões Central Mineira (n=3), Metropolitana (n=9), Zona da Mata (n=2), Norte de Minas (n=4), Campo das Vertentes (n=1), Vale do Rio Doce (n=2) e Triângulo Mineiro (n=4). Nos trabalhos do Me. Matheus Soares Arruda, Dra. Livia Sacchetto e da Dra. Natália Ingrid Silva, os animais foram negativos para detecção por RT-qPCR de YFV, CHIKV e MAYV.

Para a realização do teste adaptado em amostras de tecido hepático de PNH, foram preparados homogenatos com fígados das carcaças que estavam armazenados em freezer a -70°C . Os homogenatos foram preparados utilizando a mesma metodologia descrita no tópico 4.4.1. Para uma triagem inicial, optou-se por fazer o teste utilizando um poço (replicata) para cada diluição de cada amostra. No caso de algum animal apresentar neutralização acima de 65% na diluição 1:20, na triagem inicial, o teste seria repetido com a realização de triplicatas nas diluições 1:20-1:80, para cada diluição para cada animal, com a adição da diluição 1:160. Os testes foram realizados como descrito no tópico 4.4.1. Foram utilizados controle positivo (soro de animal infectado com CHIKV), controle negativo de soro de animal não infectado e controle negativo de homogenato de fígado de animal não infectado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Investigação molecular de CHIKV em PNH

Das 407 amostras testadas, a maioria foi coletada em áreas urbanas (51%, n=210), isso possivelmente devido ao fato de a coleta das carcaças pelo programa de vigilância da prefeitura ser baseado em notificações da população da presença de animal morto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a). Dessa forma, a chance de um animal morto ser encontrado em área urbana, com maior concentração de pessoas, é maior do que em áreas rurais, que somam 39% (n=162) das carcaças testadas nesse estudo, e do que em áreas periurbanas, que somam 7% (n=29).

Outra característica do conjunto de amostras deste estudo é a predominância de animais do gênero *Callithrix* (75%, n=308), PNH comumente encontrado em áreas urbanas. Em trabalhos semelhantes de detecção molecular de arbovírus em amostras de PNH também foi observado que a maioria dos animais pertencem ao gênero *Callithrix* (GARCIA-OLIVEIRA *et al.*, 2023; SACCHETTO *et al.*, 2020). Isso pode ser justificado pelo fato de o gênero ter se adaptado muito bem a viver próximo a áreas urbanas, facilitando que as carcaças sejam mais encontradas do que as de outros gêneros que vivem mais afastadas de regiões densamente povoadas (DUARTE *et al.*, 2012).

As 407 amostras de RNA de fígado de carcaças de PNH foram submetidas à RT-qPCR com iniciadores para a proteína β -actina e todas foram positivas, indício de que a extração de ácidos nucleicos ocorreu de maneira satisfatória. Sendo assim, quando submetidas à RT-qPCR com iniciadores específicos para o gene E1 não foi possível detectar o RNA de CHIKV em nenhuma das amostras testadas.

É sabido que a molécula de RNA é de fácil degradação (HOUSELEY e TOLLERVEY, 2009), isso somado ao fato de que as amostras testadas são advindas de carcaças de PNH coletadas nos ambientes sem controle de quanto tempo ficaram expostas ao calor ou umidade, pode ter influenciado na não detecção do RNA viral. Com a degradação da carcaça do animal é possível que o processo de degradação de RNA viral no fígado tenha sido acelerado (SAMPAIO-SILVA *et al.*, 2013). É descrito que o RNA é rapidamente degradado após a morte, isso ocorre especialmente mais rápido em órgãos ricos em ribonucleases, como o fígado por exemplo (BAUER, 2007). Esses fatores podem ter dificultado a detecção do RNA viral nos fígados das carcaças testadas neste estudo.

A viremia causada pela infecção do CHIKV em PNH é curta, sendo desenvolvida de 1-2 dias após a inoculação e descrita com duração de 3 a 5 dias (BROECKEL *et al.*, 2015; PAUL *et al.*, 1968). Dessa forma os resultados aqui apresentados podem indicar que os

animais não estavam infectados no momento da morte, o que não descarta a possibilidade de eles terem sido infectados com CHIKV durante sua vida.

Apesar da não detecção molecular de CHIKV em PNH de vida livre no sul do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2019) e da não detecção molecular e sorológica de CHIKV em PNH no nordeste em 2014 (CATENACCI *et al.*, 2018), a detecção de anticorpos anti-CHIKV em PNH já foi demonstrada (MOREIRA-SOTO *et al.*, 2018). O trabalho de Moreira-Soto e colaboradores detectou por PRNT anticorpos anti-CHIKV em soro de animais do nordeste brasileiro, entre 2013 e 2016, indicando que os animais poderiam ter tido contato prévio com o vírus e foram infectados. A detecção de anticorpos anti-CHIKV em PNH no Brasil, juntamente com o cenário epidemiológico do CHIKV em Minas Gerais, ressalta a importância da vigilância epidemiológica do vírus em PNH. Com a vigilância epidemiológica, é possível detectar a circulação viral em hospedeiros silvestres, de forma a adotar medidas que evitem o início da circulação do vírus em populações humanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a).

Os dados de investigação molecular deste trabalho estão incluídos em manuscrito que está em preparação.

5.2 Otimização de teste de neutralização viral por redução de placa com tecido hepático de animais experimentalmente infectados

Utilizando o homogenato preparado a partir de amostras de fígado dos animais experimentais, foram realizados ensaios de neutralização viral adaptados, tendo como base a PRNT clássica que utiliza amostras de soro.

Considerando os seis animais infectados, o valor mediano de neutralização (de três réplicas experimentais) variou de 68,85% a 40,71% na diluição 1:20. Dos seis animais, cinco apresentaram valor de neutralização acima de 50%, sendo que três deles apresentaram neutralização acima de 60%. Na diluição 1:40 os valores tiveram variação de 47,24% a 25%, sendo que dois animais tiveram mediana de neutralização acima de 40%. Nas diluições 1:80 e 1:160 não foram observadas mediana de neutralização acima de 50%, sendo que na diluição 1:80 o valor máximo observado foi 32,37% e o mínimo observado foi de 12,14%. Para a diluição de 1:160 os valores de mediana foram mais baixos, sendo a máxima 15,66% e a mínima 0% (Tabela 3)(Figura 9).

Os valores de neutralização para as amostras de animais *mock* foram menores quando comparados com amostras de animais infectados. O valor mediano de neutralização (três

experimentos independentes) variou de 17,27% a 0% na diluição de 1:20, sendo que quatro animais apresentaram neutralização de 0%. E na diluição 1:40, a neutralização variou de 7,27% a 0%, sendo que três animais apresentaram neutralização de 0%. Na diluição 1:80 apenas um animal apresentou neutralização de 6,58%, e o restante de 0%. Já na diluição 1:160 não foi observada neutralização em nenhum dos animais (Tabela 3)(Figura 9).

Tabela 3: Medianas de neutralização (%) obtidas nos três testes de neutralização contra CHIKV utilizando homogenato de fígado de animais experimentais.

Medianas de neutralização (%) por diluição, por experimento												
Animal	1:20			1:40			1:80			1:160		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
inf1	40,71	59,18	38,61	25,00	50,20	22,15	12,14	41,22	4,43	0,71	28,16	0,63
inf2	46,49	70,09	64,81	27,76	52,99	37,24	11,71	47,86	23,17	16,39	15,38	9,09
inf3	59,71	68,18	59,20	46,04	68,18	39,80	32,37	51,82	23,75	10,79	33,64	4,35
inf4	50,73	58,55	51,37	35,48	40,93	11,85	17,89	20,21	17,33	12,61	30,57	0,00
inf5	46,99	68,85	73,62	30,72	58,20	47,24	22,29	44,26	31,29	15,66	40,98	12,88
inf6	45,29	65,16	66,19	30,09	61,29	35,25	10,64	31,61	3,60	8,81	0,00	0,00
m1	17,27	32,51	11,31	7,27	13,43	0,00	0,00	15,55	0,00	0,00	0,00	0,00
m2	14,04	0,00	0,00	8,09	7,24	0,00	19,15	6,58	0,00	0,00	0,00	0,00
m3	28,83	0,00	0,00	18,02	1,35	0,00	0,00	2,70	0,00	0,00	10,14	0,00
m4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,53	0,00
m5	0,00	8,19	2,58	0,00	19,57	0,00	0,00	18,86	0,00	0,00	0,00	0,00
m6	0,00	2,67	0,00	0,00	1,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

As medianas de porcentagem de neutralização apresentadas foram obtidas a partir de 3 experimentos independentes com três replicatas de cada diluição para cada animal. Os valores são referentes aos testes realizados com seis animais experimentalmente infectados e seis animais *mock*. inf: infectado. m: *mock*.

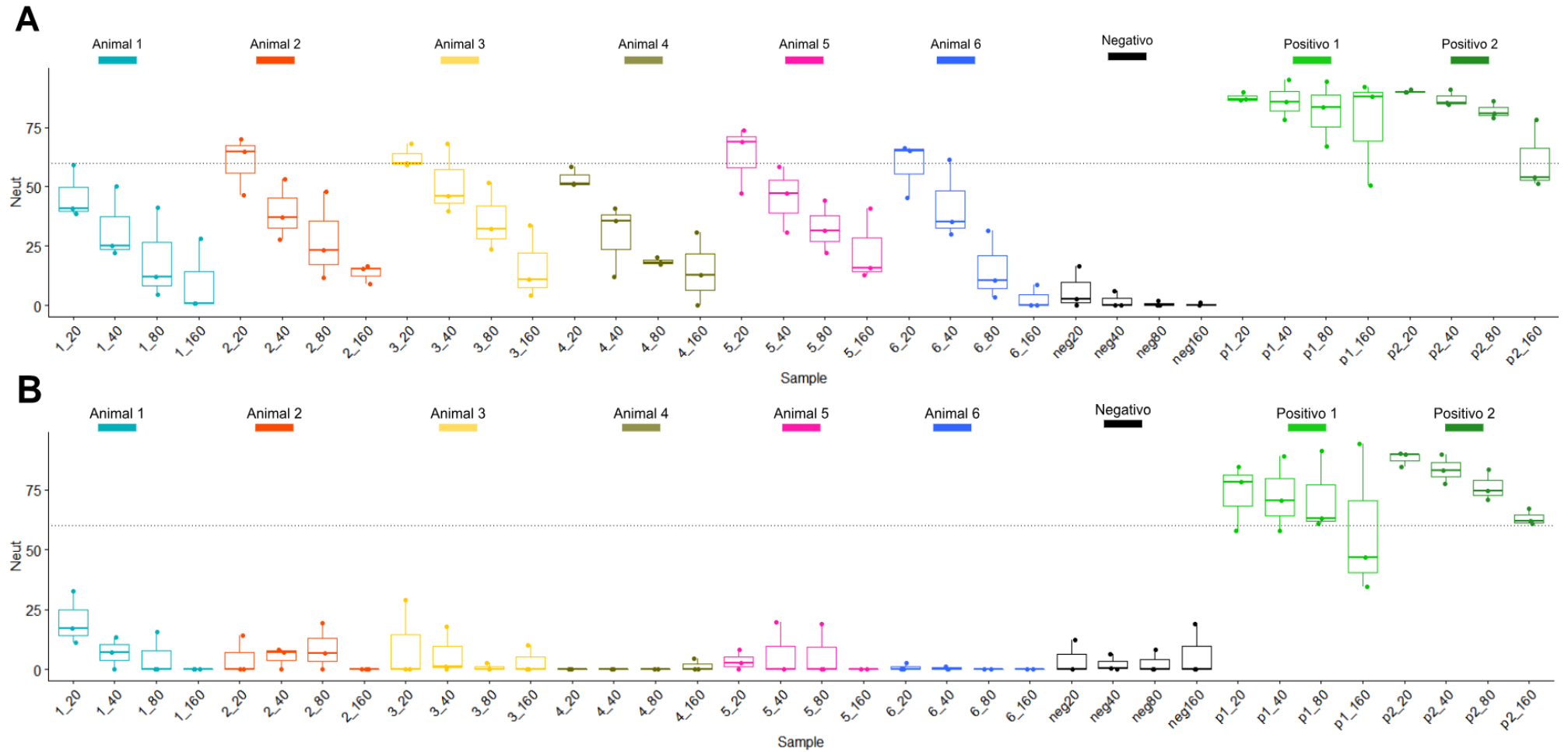


Figura 9: Valores medianos de neutralização (%) dos testes com animais infectados com CHIKV e animais *mock*.

Os valores de mediana de neutralização, representados por pontos nos gráficos, foram obtidos de três experimentos independentes com três replicatas para cada diluição/animal. Figura A: animais infectados. Figura B: animais *mock*. Para cada diluição/animal: n=3. Para os controles: n=3. Em azul: animal 1; em vermelho: animal 2; em amarelo: animal 3; em marrom: animal 4; em rosa: animal 5; em azul escuro: animal 6. Pos 1: soro de animal infectado (verde claro). Pos 2: soro de animal infectado + fígado de animal não infectado (verde escuro). Negativo: homogenato de animal não infectado (preto).

Apesar da maioria dos valores de neutralização obtidos para cada animal, em cada uma das três replicatas experimentais, serem homogêneos entre si, é possível observar variações (Tabela 3)(Figura 9). Isso pode ser associado às variações implícitas da própria técnica de PRNT, pois pequenas variações na execução, como pipetagem ou condições da cultura celular, podem gerar impacto no resultado final (WHO, 2008). Mesmo com as variações naturais do ensaio biológico, a PRNT é considerada um teste com alta especificidade e sensibilidade (WHO, 2008). Essas diferenças entre os valores de neutralização em cada experimento independente são esperadas, e somado a isso a utilização de amostra não convencional, homogenato de fígado, pode intensificar essas variações. Alguns estudos já demonstraram que *debris* celulares e células lisadas podem interferir na contagem de PFU, reduzindo a contagem (HOLLAND *et al.*, 1959). Mas a interferência de *debris* celulares é diminuída à medida que a diluição aumenta (HOLLAND *et al.*, 1959). De maneira similar, neste estudo, os valores de mediana obtidos para os animais *mock*, que na diluição 1:20 variou em torno de 17%, tiveram redução da porcentagem de neutralização mediana à medida que aumentou a diluição, de forma que e após a diluição 1:80 a mediana de neutralização foi 0%.

Outra variação observada nos dados gerados é entre os valores medianos de neutralização quando comparado entre os diferentes animais infectados (Tabela 3)(Figura 9). É sabido que essa variação entre os animais é devida a variação na resposta imune individual (BRODIN e DAVIS, 2017), sendo possível que alguns animais tenham altos valores de neutralização enquanto outros tenham valores mais baixos.

Em relação às análises GLMM realizadas, foi possível observar que existe diferença estatística entre os grupos *mock* e infectado ($p < 0,001$), sendo possível a distinção dos dois grupos quando analisados os valores de neutralização medianos (Tabela 4). Quando feitas as análises da mediana de neutralização em relação à diluição, foi possível observar maiores valores de neutralização relacionados às menores diluições e menores valores de neutralização relacionados às maiores diluições em ambos os grupos (*mock* e infectado), sendo possível a distinção entre as diluições ($p < 0,001$) (Tabela 4). Nas análises realizadas considerando a interação da diluição com o grupo a qual pertencem as amostras, também foi possível a diferenciação ($p < 0,001$). Sendo que à medida que a diluição aumenta, a diferença estatística entre os grupos infectado e *mock* diminui, mas ainda continua significativa ($p < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da análise GLMM da mediana de neutralização viral em relação aos grupos (infectado e mock), diluição e grupo/diluição

Variável dependente	Variáveis independente	F	p
Mediana de neutralização (%)	Grupo (infectado/ <i>mock</i>)	283.587	< 0,001
	Diluição	35.669	< 0,001
	Grupo/diluição	22.070	< 0,001

Valores de mediana de neutralização (variáveis dependentes) obtidos da mediana de três experimentos independentes para cada animal (n=6) e cada diluição (1:20 a 1:160). Foi analisada a resposta da variável dependente em relação às variáveis independentes grupo (mock ou infectado), diluição (1:20 a 1:160) e a interação do grupo e diluição. A partir disso foram obtidos valores de F relacionados ao teste e valores de p. Diferença significativa quando $p < 0,05$.

Quando o valor mínimo absoluto de neutralização observado para cada animal infectado/diluição foi comparado com o valor máximo absoluto de neutralização para cada animal *mock*/diluição (tabela 5), foi observada diferença significativa quando analisados em relação às três variáveis independentes ($p > 0,001$ e $p = 0,002$) (Tabela 6). Isso demonstra que mesmo utilizando os menores valores obtidos para animais infectados e os maiores obtidos para os *mock* é possível a diferenciação entre os grupos em cada diluição realizada.

Tabela 5: Valores máximos e mínimos neutralização (%) obtidos nos três testes de neutralização contra CHIKV utilizando homogenato de fígado de animais experimentais.

Valores mínimos de neutralização (%) por diluição dos animais infectados												
Animal	01:20			01:40			1:80			1:160		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
inf1	39,29	51,84	31,01	6,43	46,12	22,15	7,14	31,43	0,63	0,00	13,47	0,00
inf2	45,15	58,12	60,70	25,75	51,28	34,90	6,35	41,88	14,37	13,04	13,68	7,33
inf3	58,27	64,55	54,52	34,53	61,82	30,43	23,74	48,18	22,41	7,19	29,09	0,00
inf4	47,21	54,40	21,58	33,72	30,57	11,85	14,37	15,03	4,56	2,64	27,46	0,00
inf5	45,78	68,03	73,01	30,12	53,28	46,01	19,88	37,70	23,31	4,82	27,05	3,68
inf6	43,47	62,58	65,47	22,80	56,13	31,65	8,21	29,03	1,44	4,56	0,00	0,00
Valor máximos de neutralização (%) por diluição dos animais mock												
Animal	01:20			01:40			80			160		
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
m1	18,18	32,86	13,15	20,00	13,78	23,55	0,00	15,90	0,00	0,00	0,00	0,00
m2	17,45	9,21	0,00	21,70	7,89	0,00	22,55	8,55	0,00	0,00	4,61	0,00
m3	31,53	10,14	0,00	19,82	2,03	0,00	0,90	8,78	8,33	0,00	10,81	0,00
m4	0,00	0,00	0,00	0,00	2,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,14	0,00
m5	15,91	11,74	6,27	18,18	23,84	0,00	0,00	20,28	0,00	0,00	1,78	0,00
m6	0,00	6,00	0,00	0,00	13,33	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	5,33	0,00

Os valores máximos e mínimos absolutos de neutralização apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes com três replicatas de cada diluição para cada animal. Os valores são referentes aos testes realizados com seis animais experimentalmente infectados e seis animais *mock*. inf: infectado. m: *mock*.

Tabela 6: Resultado da análise GLMM de resposta do valor mínimo absoluto de neutralização viral dos animais infectados e do valor máximo absoluto de neutralização viral dos animais mock para os grupos (infectado e mock), diluição e grupo/diluição

Variável dependente	Variáveis independentes	F	Valor p
neutralização (%)	Grupo (infectado/mock)	134.120	< 0,001
	Diluição	34.214	< 0,001
	Grupo/diluição	16.216	< 0,001

Valores mínimos absolutos de neutralização dos animais infectados e valores máximos absolutos de neutralização dos animais *mock* (variáveis dependentes) obtidos de três experimentos independentes para cada animal (n=6) e cada diluição (1:20 a 1:160). Foi analisada a resposta da variável dependente em relação às variáveis independentes grupo (mock ou infectado), diluição (1:20 a 1:160) e a interação do grupo e diluição. A partir disso foram obtidos valores de F relacionados ao teste e valores de p. O valor de F representa a força do teste estatístico. Diferença significativa quando p<0,05.

Ao fazer a análise da curva ROC com a neutralização mediana dos três experimentos independentes, obtida para cada animal/diluição (Tabela 3), foi observado que, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80 ($AUC=1,0$; $95\%CI \geq 1,0-1,0$; $p=0,0039$), foi possível a diferenciação dos valores dos animais infectados e dos valores obtidos para os animais *mock* (Figura 10). Na diluição 1:160 também foi observada diferença estatística entre os valores do grupo infectado e do grupo *mock* ($AUC=0,91$; $95\%CI \geq 0,72-1,0$; $p=0,01$) (Tabela 7).

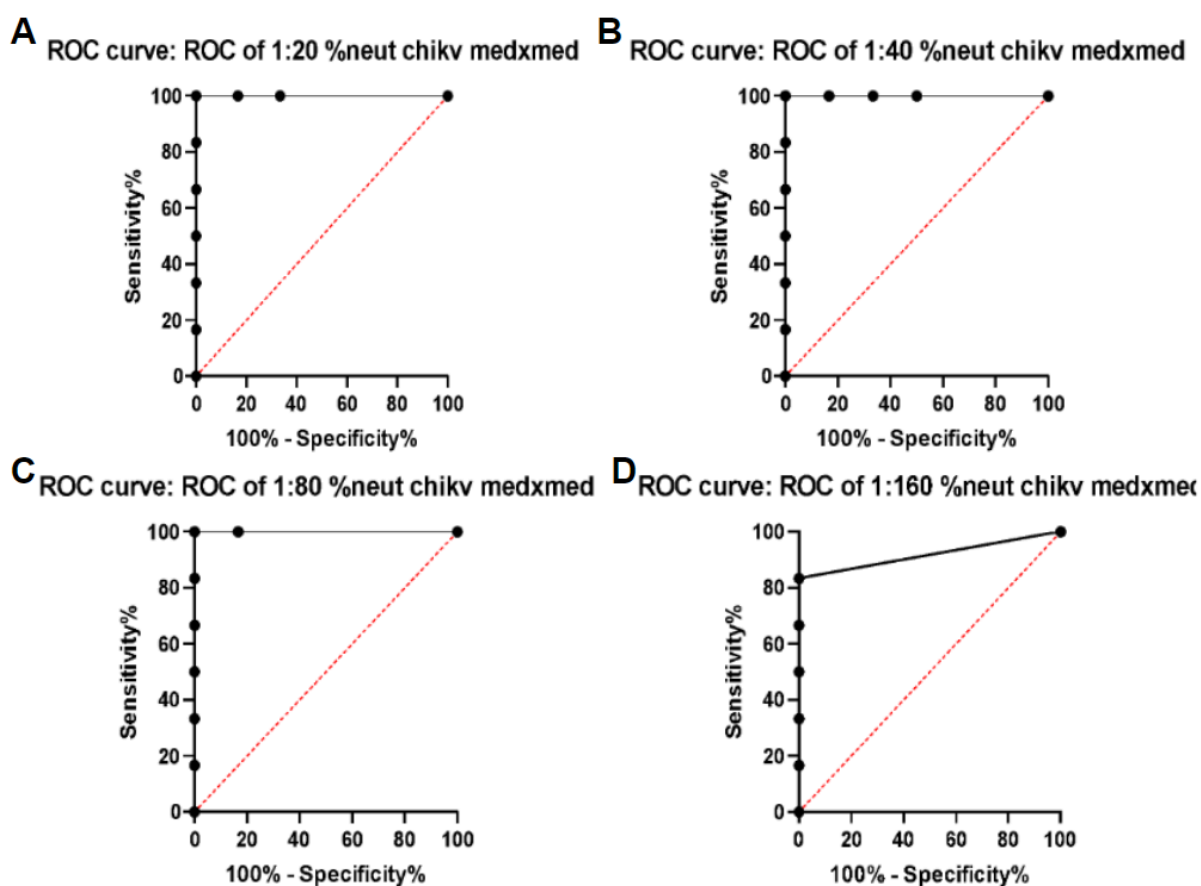


Figura 10: Análise da curva ROC com medianas de neutralização dos testes de neutralização adaptados utilizando homogenato de fígado de camundongos infectados e *mock*.

Curva ROC realizada com a mediana das medianas de três experimentos independentes realizados com animais *mock* e animais experimentalmente infectados com CHIKV. Foram realizadas comparações entre as medianas de cada diluição dos animais infectados com as medianas da respectiva diluição dos animais *mock*. Gráfico A: diluição 1:20; gráfico B: 1:40, gráfico C: 1:80 e gráfico D: 1:160. ROC: *receiver operating characteristic*. Análises e gráficos gerados no GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, USA).

A sensibilidade representa a proporção de indivíduos que têm a infecção e tem resultado positivo, e a especificidade a proporção de indivíduos que não são infectados e são

testados negativamente. Os valores de *cut off* de porcentagem de neutralização fornecidos pela análise da curva ROC sugerem que um valor de 46,04% de neutralização na diluição 1:20 oferece 83% de sensibilidade e 100% de especificidade ao teste. Na diluição 1:40 o valor de *cut off* seria de 30,13% de neutralização (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da curva ROC das medianas de neutralização de animais infectados com CHIKV comparados com animais *mock*

Mediana de neutralização dos infectados x mediana de neutralização dos <i>mock</i>					
Diluição	AUC (95% CI)	valor de p	<i>Cut off</i>	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)
1:20	1,0 (1,0-1,0)	0,0039	46,04	83,3% (43,6% - 99,1%)	100% (60,9% - 100%)
1:40	1,0 (1,0 -1,0)	0,0039	30,13	83,3% (43,6% - 99,1%)	100% (60,9% - 100%)
1:80	1,0 (1,0 -1,0)	0,0039	11,39	83,3% (43,6% - 99,1%)	100% (60,9% - 100%)
1:160	0,91 (0,72-1,0)	0,0163	5,7	66,6% (30% - 94,08%)	100% (60,9% - 100%)

Valores de medianas de neutralização obtidos das medianas de três experimentos independentes para cada animal infectado (n=6) e cada animal *mock* (n=6) de cada diluição. Com a curva ROC foram comparadas as diluições 1:20 a 1:160 dos dois grupos de animais. Nas diluições 1:20 a 1:80 foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos comparados, enquanto na diluição 1:160 não foi observada diferença. Os valores de *cut off* escolhidos levaram em consideração os maiores valores possíveis de especificidade e sensibilidade. AUC: área sob a curva. *Cut off*: ponto de corte. CI: intervalo de confiança; ROC: *receiver operating characteristic*.

Usando o menor valor mediano de neutralização observado para cada animal infectado/diluição e o maior valor mediano de neutralização de cada animal *mock*/diluição (Tabela 5) foi realizada a análise da curva ROC. Mesmo nesse cenário, o teste foi capaz de diferenciar os dois grupos nas diluições 1:20 (AUC=1,0; 95%CI $\geq$ 1,0-1,0; p=0,0039), 1:40 (AUC=0,91; 95%CI $\geq$ 0,74-1,0; p=0,0163)(Figura 11). Nas diluições 1:80 (AUC=0,69; 95%CI $\geq$ 0,37-1,0; p=0,2623) e 1:160 (AUC=0,63; 95%CI $\geq$ 0,31-0,96; p=0,4233) não foi observada diferença estatística entre os grupos, o que significa que o teste não foi capaz de diferenciar os dois grupos nessa diluição (Figura 11).

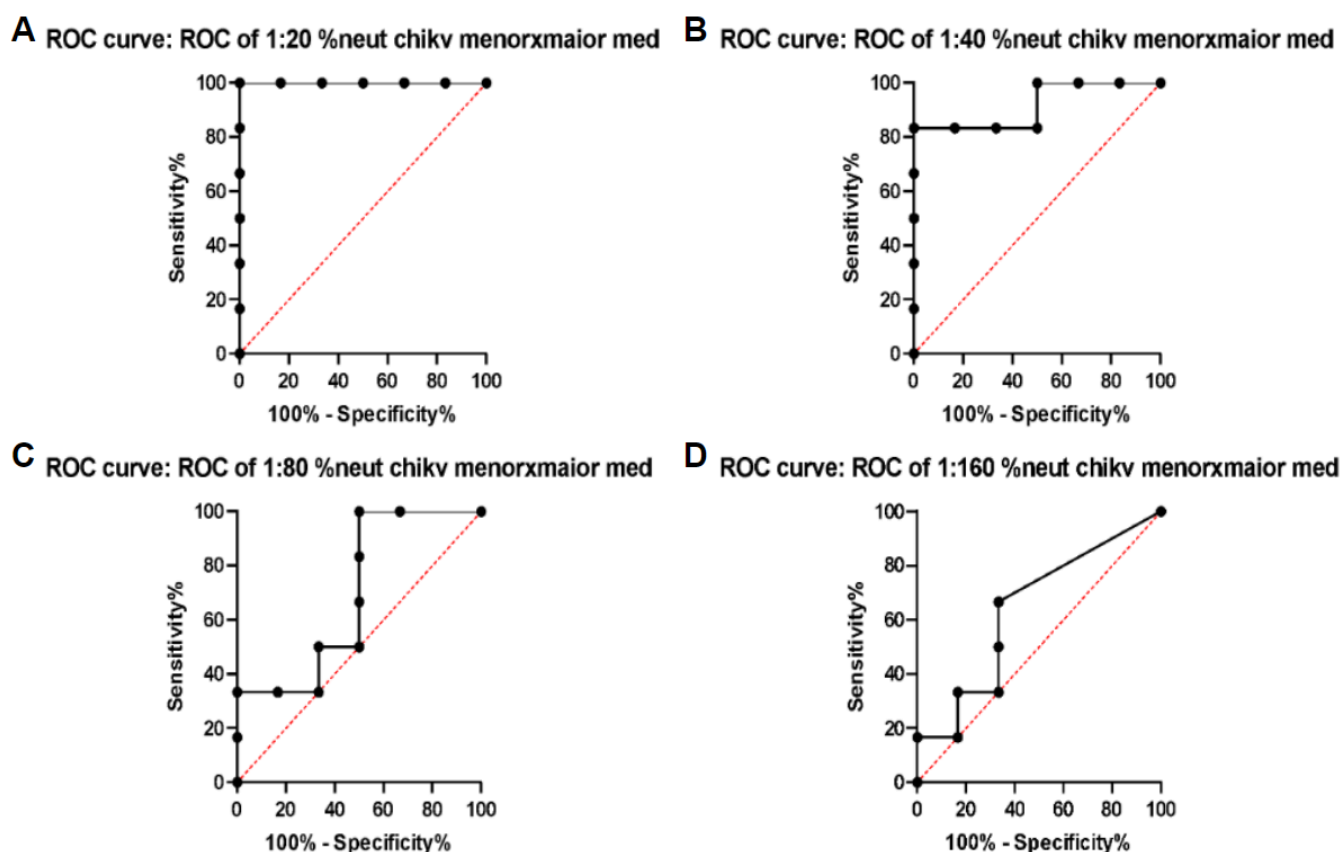


Figura 11: Análise da curva ROC com as menores medianas de neutralização dos testes de neutralização adaptados utilizando homogenato de fígado de camundongos infectados e *mock*. Curva ROC realizada com a menor mediana de três experimentos independentes realizados com animais *mock* e animais experimentalmente infectados com CHIKV. Foram realizadas comparações entre as menores medianas de cada diluição dos animais infectados com as maiores medianas da respectiva diluição dos animais *mock*. Gráfico A: diluição 1:20; gráfico B: 1:40, gráfico C: 1:80 e gráfico D: 1:160. ROC: *receiver operating characteristic*. Análises e gráficos gerados no GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, USA).

Os resultados obtidos para as análises de curva ROC deste estudo possuem valores de sensibilidade e especificidade próximos aos observados em outros trabalhos que avaliaram esses parâmetros em testes de neutralização viral anti-YFV utilizando soro (SIMÕES *et al.*, 2012). Em testes de micro-PRNT com *cut off* de 50% (SN50) com o YFV foi obtida sensibilidade e especificidade de 91% e 72%, respectivamente, enquanto que para o mesmo teste com SN90 foi obtida sensibilidade de 100% e especificidade de 94% (SIMÕES *et al.*, 2012). Um teste ideal seria aquele com valores de sensibilidade e especificidade de 100%, porém isso é dificultado pelas limitações dos próprios testes. Dessa forma se optou por *cut offs* com os maiores valores possíveis de sensibilidade e especificidade, considerando um valor de neutralização que esteja em consonância com os *cut offs* utilizados para PRNT convencional (50%), que utilizam amostras de soro (RASULOVA *et al.*, 2022; SIMÕES *et*

al., 2012). Com análises feitas em paralelo com os resultados dos testes de neutralização para YFV e MAYV utilizando homogenato de animais experimentais (OLIVEIRA, 2023; ARRUDA, 2023) e considerando o fato de que os *debris* celulares dos homogenatos podem interferir e gerar uma neutralização inespecífica, optou-se por valores de *cut off* maiores. Para uma maior segurança no resultado dos testes adaptados, foi escolhido *cut off* de 65% na diluição 1:20 e de 40% na diluição 1:40 para os testes realizados com amostras ambientais para detecção de indícios de infecção natural. Dessa forma, aumentando o valor de *cut off*, é esperado que o número de falsos positivos seja diminuído.

Após as análises e observação dos dados, é possível que exista uma redução de placas residual em ambos os grupos analisados, muito provavelmente devido à presença de *debris* celulares no tipo de amostra utilizada (HOLLAND e MCLAREN, 1959), especialmente considerando que houve uma neutralização viral inespecífica nos animais mock, dependente da diluição. Porém, devido a diferença estatística no teste GLMM quando comparados as medianas de neutralização dos animais infectados e dos animais mock e também entre o valor mínimo absolutos dos infectados e o máximo absoluto dos animais mock, observamos que é possível diferenciar os dois grupos. Os resultados da curva ROC também corroboram com esse resultado ao demonstrar que é possível a diferenciação dos grupos.

5.3 Teste de neutralização viral utilizando tecido hepático de carcaças de PNH

Das 25 amostras de homogenato de fígado de PNH testados, uma apresentou valor de neutralização acima de 90% na diluição 1:20, 79% na 1:40 e 64% na 1:80 (Tabela 8). As 24 amostras restantes foram consideradas negativas, e os valores de redução de placas variaram de 0% a 43% na diluição 1:20 (Tabela 8).

Tabela 8: Porcentagem de neutralização do teste de neutralização adaptado utilizando homogenato de fígado de PNH.

PNH	Neutralização (%)		
	1:20	1:40	1:80
2	14,2	18,3	17,5
4	27,1	2,0	14,5
8	24,2	15,0	6,7
24	43,5	36,5	29,4
39	16,9	15,3	4,3
52	93,0	79,7	64,1
54	0,0	0,0	0,0
65	35,2	33,6	8,6
70	6,0	0,0	15,7
71	11,7	0,0	0,0
79	14,5	12,3	0,0
106	39,1	0,0	20,3
111	21,6	31,3	0,0
116	0,0	0,0	0,0
127	12,1	11,2	19,3
131	42,5	48,3	55,0
170	38,1	20,1	3,7
171	17,3	18,3	34,6
208	1,2	0,0	0,0
209	0,0	0,0	0,0
229	19,2	14,4	20,2
232	43,3	12,5	22,1
235	13,8	5,1	0,0
246	0,0	0,0	0,0
248	8,2	6,7	14,2

Valores obtidos de uma replicata de cada diluição, para cada animal, sendo as diluições 1:20, 1:40 e 1:80. Experimento realizado com homogenato feito de tecido hepático de carcaça de PNH. PNH: primata não humano.

Após a repetição em triplicata da amostra positiva na primeira triagem, foi obtido valor mediano de neutralização de 83,76% na diluição 1:20, 67,52% na 1:40 e 34,19% na 1:80 (Tabela 9). Esta amostra foi coletada em área urbana da cidade de Curvelo em 2017, na

mesorregião Central Mineira, e foi classificada com estado de conservação intermediário. A situação epidemiológica na cidade de Curvelo, em 2017, era de baixa incidência, com poucos casos em humanos registrados. Já foi descrita a detecção de anticorpos neutralizantes anti-CHIKV em amostras de soro de PNH no Brasil (MOREIRA-SOTO *et al.*, 2018), indicando a infecção prévia de PNH por CHIKV e a circulação do vírus nesses hospedeiros no Brasil. Alguns estudos que investigaram infecção por CHIKV em PNH no Brasil, por PRNT, utilizando amostras de soro, não encontraram animais positivos (CATENACCI *et al.*, 2018). Essa falta de detecção pode ser associada com a não circulação viral nesses hospedeiros. Dessa forma, são necessários mais estudos para entender melhor a situação da circulação do CHIKV no Brasil, nos PNH.

Tabela 9: Mediana de neutralização de teste neutralização com homogenato de PNH.

Diluição	Neutralização (%)
1:20	83,76
1:40	67,52
1:80	34,19
1:160	37,61
1:320	11,21

As medianas foram obtidas através de teste realizado em triplicata. São apresentados dados das diluições 1:20 a 1:320. Experimento realizado com homogenato feito de tecido hepático de carcaça de primata não humano.

Das amostras testadas, 14 apresentaram estado de conservação da carcaça considerado bom, cinco foram consideradas intermediárias, quatro ruins e em duas não foi possível a avaliação. Já foi descrita a utilização de amostras de carcaças e cadáveres para a detecção de anticorpos (LAI *et al.* 2022; TRYLAND *et al.*, 2006; ZARNKE *et al.*, 2001). No contexto da utilização de amostra de tecido de carcaças para realização de testes sorológicos, Tryland e colaboradores demonstraram que é possível a utilização de fluidos corporais de carcaças até 11 dias após a morte para testes sorológicos (TRYLAND *et al.*, 2006).

Alguns estudos já utilizaram amostras de tecido e fluidos para realização de testes sorológicos. Gamble e colaboradores, por meio de ensaios imunoenzimáticos, detectaram anticorpos contra o agente causador da triquinose suína em fluidos obtidos pela trituração de tecido muscular de porcos. Quando comparados, os testes feitos com o fluido do tecido foram equivalentes aos testes feitos com o soro dos animais (GAMBLE E PATRASCU,

1996). Em consonância, outro trabalho utilizou o líquido do descongelamento de músculo de porcos para a detecção de anticorpos anti-*T. spiralis* por ELISA. Nos testes foi possível observar que a utilização da amostra pouco diluída (1:10) obteve-se sensibilidade e especificidade maiores que 90%, e na diluição 1:100 valores maiores de 80% (BECK et al., 2005). Resultados obtidos com testes adaptados com homogenato de animais experimentalmente infectados com YFV e MAYV corroboram com esses estudos, sendo possível a diferenciação de animais infectados e não infectados no teste de neutralização adaptado. Além da neutralização observada no teste adaptado de YFV realizada com amostras de homogenato de PNH, foi realizado teste imunocromatográfico para detecção de IgM anti-YFV e obteve-se amostras positivas, indicando a detecção de anticorpos contra o vírus no homogenato de fígado (dados não publicados).

Considerando o valor adequado de *cut off* proposto com base nos testes de neutralização adaptados utilizando homogenato de animais experimentalmente infectados, o resultado dos testes com homogenato de fígado de PNH indicam uma possível infecção prévia de PNH por CHIKV. A detecção de anticorpos anti-CHIKV em PNH pode ser uma evidência da circulação viral nesses hospedeiros, e é um alerta sobre a possibilidade do estabelecimento do ciclo silvestre viral, que dificulta a erradicação e controle da doença em humanos. Dessa forma, é importante a contínua vigilância epidemiológica do CHIKV, tanto com abordagens moleculares e sorológicas.

Os resultados em conjunto indicam que o teste de neutralização viral adaptado utilizando fígado de carcaça de PNH pode contribuir com a vigilância epidemiológica tanto do CHIKV quanto de outros vírus no Brasil, se tornando uma opção viável de teste quando amostras de soro não são possíveis de serem coletadas. É recomendável que os testes de neutralização sejam preferencialmente realizados com soro, porém em sua ausência a amostra de fígado pode ser utilizada desde de que os resultados sejam analisados com o valor de *cut off* proposto (65%) e que a clarificação do homogenato seja satisfatória, a fim de minimizar o efeito dos *debris* celulares na redução de placas e evitar resultados falsos positivos. Com a investigação de infecções prévias em PNH, pode-se entender melhor a dinâmica de circulação viral nos PNH, o que pode guiar ações públicas para manejo de áreas de risco para a circulação viral, evitando que a população humana seja infectada.

Os dados deste trabalho estão em fase final de escrita para manuscrito.

6. CONCLUSÕES

Nenhuma das amostras de fígado de carcaça de PNH foi positiva para a detecção molecular do CHIKV.

Foi observada diferença estatística entre os valores de neutralização dos animais infectados e dos animais *mock*, indicando atividade neutralizante em homogenato de fígado de camundongos experimentalmente infectados.

Um PNH foi positivo para o teste de neutralização adaptado para CHIKV, indicando uma infecção prévia pelo vírus.

7. PERSPECTIVAS

Realizar teste de neutralização adaptada com homogenato de PNH positivo, adicionando a etapa de filtragem da amostra. Além disso, a realização de teste imunocromatográfico IgM anti-CHIKV e de ELISA com homogenato de fígado do PNH positivo.

Realizar teste de neutralização adaptado contra MAYV com o homogenato de PNH positivo no teste anti-CHIKV, para verificar a reação cruzada entre os Alfavírus.

8. OUTRAS ATIVIDADES NO MESTRADO

Participação em eventos científicos

XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. 2022.

IX Simpósio de Microbiologia da UFMG. 2022.

V FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas - common interests and collaboration between north - south. 2023.

Simpósio One Health Brasil. 2023.

XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. 2023.

Organização de eventos científicos e co-orientação

IX Simpósio de Microbiologia da UFMG - A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã. 2022. Carga horária: 30h

Co-orientação da aluna de iniciação científica Anna Catarina Dias Soares Guimarães.

Apresentação de trabalhos em eventos científicos

COSTA, T. A.; ARRUDA, M. S. ; OLIVEIRA, G. F. G. ; MOREIRA, G. D. ; MELLO, E. M. ; VASILAKIS, N. ; HANLEY, K. ; DRUMOND, B. P. . MOLECULAR INVESTIGATION OF CHIKUNGUNYA VIRUS IN NON-HUMAN PRIMATES IN THE STATE OF MINAS GERAIS IN 2017. In: V FAMERP-UTMB, 2023, São José do Rio Preto, SP. sessão de poster, 2023.

COSTA, T. A.; ARRUDA, M. S.; OLIVEIRA, G. F. G.; MOREIRA, G. D.; MELLO, E. M.; VASILAKIS, N.; HANLEY, K.; DRUMOND, B. P. . DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS RNA IN NON-HUMAN PRIMATES IN MINAS GERAIS, BRAZIL, 2018. In: 34º Congresso Brasileiro de Virologia, 2023, Ouro Preto, MG. sessão de poster, 2023.

OLIVEIRA, G. F. G.; GUIMARAES, A. C. D. S.; MOREIRA, G. D.; **COSTA, T. A.**; MELLO, E. M.; SILVA, M. C.; HANLEY, K.; VASILAKIS, N.; DRUMOND, B. P. YELLOW ALERT - FINDINGS FROM A MOLECULAR INVESTIGATION (2021- 2023): CONTINUED DETECTION OF YELLOW FEVER VIRUS IN NON-HUMAN PRIMATES FROM URBAN AREAS IN MINAS GERAIS STATE. In: 34º Congresso Brasileiro de Virologia, 2023, Ouro Preto, MG. sessão de poster, 2023.

OLIVEIRA, G. F. G.; MOREIRA, G. D.; GUIMARAES, A. C. D. S.; **COSTA, T. A.**; ARRUDA, M. S.; MELLO, E. M.; VASILAKIS, N.; HANLEY, K.; DRUMOND, B. P. YELLOW FEVER VIRUS MOLECULAR INVESTIGATION IN NON-HUMAN PRIMATES: FINDINGS FROM A STUDY IN MINAS GERAIS, BRAZIL (2021-2023). In: V FAMERP-UTMB, 2023, São José do Rio Preto, SP. sessão de poster, 2023.

ARRUDA, M. S.; OLIVEIRA, G. F. G.; **COSTA, T. A.**; CINCUNCISAO, D. J.; Testa MF; PASCHOAL, A.; Vilela DAR; HANLEY, K.; VASILAKIS, N.; DRUMOND, B. P. SEROLOGICAL EVIDENCE OF CONTINUED ENZOOTIC CIRCULATION OF YELLOW FEVER, IN MINAS GERAIS - BRAZIL, FOLLOWING THE 2017/2018

OUTBREAKS. In: 34º Congresso Brasileiro de Virologia, 2023, Ouro Preto, MG. sessão de poster, 2023.

OLIVEIRA, G. F. G.; MOREIRA, G. D.; **COSTA, T. A.**; MELLO, E. M.; ARRUDA, M. S.; DRUMOND, B. P. INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO YELLOW FEVER VIRUS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS EM MINAS GERAIS, 2021. In: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG ? A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã, 2022, Belo Horizonte. Sessão de poster, 2022.

REIS, E. V. S.; **COSTA, T. A.**; ARRUDA, M. S.; OLIVEIRA, G. F. G.; ARIAS, N. E. C.; VASILAKIS, N.; HANLEY, K.; DRUMOND, B. P. UTILIZAÇÃO DE TECIDO HEPÁTICO PARA A INVESTIGAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA MAYARO VIRUS E CHIKUNGUNYA VIRUS. In: IX Simpósio de Microbiologia da UFMG ? A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã, 2022, Belo Horizonte. Sessão de poster, 2022.

REIS, E. V. S.; **COSTA, T. A.**; ARRUDA, M. S.; OLIVEIRA, G. F. G.; ARIAS, N. E. C.; HANLEY, K.; VASILAKIS, N.; DRUMOND, B. P. Investigation of neutralizing antibodies against arboviruses using hepatic tissue,. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2022, Porto Seguro. Sessão de poster, 2022.

Artigos publicados e submetidos para publicação em periódicos

GARCIA-OLIVEIRA, GABRIELA F.; GUIMARÃES, ANNA CATARINA DIAS SOARES; MOREIRA, GABRIEL DIAS; **COSTA, THAIS ALKIFELES**; ARRUDA, MATHEUS SOARES; DE MELLO, ÉRICA MUNHOZ; SILVA, MARLISE COSTA; DE ALMEIDA, MUNIQUE GUIMARÃES; HANLEY, KATHRYN A.; VASILAKIS, NIKOS; DRUMOND, BETÂNIA PAIVA. YELLOW ALERT: Persistent Yellow Fever Virus Circulation among Non-Human Primates in Urban Areas of Minas Gerais State, Brazil (2021-2023). *Viruses-Basel*, v. 16, p. 31, 2024. <https://doi.org/10.3390/v16010031>

SILVA, NATÁLIA INGRID OLIVEIRA; ALBERY, GREGORY F.; ARRUDA, MATHEUS SOARES; OLIVEIRA, GABRIELA FERNANDA GARCIA; **COSTA, THAIS ALKIFELES**; DE MELLO, ÉRICA MUNHOZ; MOREIRA, GABRIEL DIAS; REIS, ERIK VINÍCIUS; SILVA, SIMONE AGOSTINHO DA; SILVA, MARLISE COSTA; DE ALMEIDA, MUNIQUE GUIMARÃES; BECKER, DANIEL J.; CARLSON, COLIN J.; VASILAKIS, NIKOS; HANLEY, KATHRYN A.; DRUMOND, BETÂNIA PAIVA . Ecological drivers of sustained enzootic yellow fever virus transmission in Brazil, 2017-2021. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, p. e0011407, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407>

BENTES, ALINE ALMEIDA; DOS SANTOS JUNIOR, WALTER REBUIE ; PESSOA, NATALIA LIMA; **COSTA, THAIS ALKIFELES**; OLIVEIRA, GABRIELA FERNANDA GARCIA; DINIZ, LILIAN MARTINS OLIVEIRA; TORRES, BRUNA RIBEIRO; TEIXEIRA, DANIELA CALDAS; MENDES, RENATA BARANDAS;

AVELAR, ANA BEATRIZ ALVIM; CAMPOS, MARCO ANTÔNIO; KROON, ERNA GEESIEN; DRUMOND, BETANIA PAIVA. Neuro-COVID-19 With or Without the Multisystem Inflammatory Syndrome (MIS-C): A Single-Center Study. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, v. online, p. 1-8, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12031-023-02109-y>

DE REZENDE, IZABELA MAURÍCIO; OLIVEIRA, GABRIELA FERNANDA GARCIA; **COSTA, THAÍS ALKIFELES**; KHAN, ASLAM; PEREIRA, LEONARDO SOARES; SANTOS, TAYRINE ARAÚJO; ALVES, PEDRO AUGUSTO; CALZAVARA-SILVA, CARLOS EDUARDO; MARTINS-FILHO, OLINDO ASSIS; TEIXEIRA-CARVALHO, ANDRÉA; LABEAUD, ANGELLE DESIREE; DRUMOND, BETÂNIA PAIVA. Yellow Fever Molecular Diagnosis Using Urine Specimens during Acute and Convalescent Phases of the Disease. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, v. 60, p. 00254-22--, 2022. <https://doi.org/10.1128/jcm.00254-22>

REZENDE, IZABELA MAURICIO DE; CENACHI, ADRIANA REGINA CAMPOLINA; **COSTA, THAIS ALKIFELES**; OLIVEIRA, GABRIELA FERNANDA GARCIA; RABELO, LIVIA; MENEZES, LETICIA MATTOS; PENIDO, INDIARA; PEREIRA, LEONARDO SOARES; ARRUDA, MATHEUS SOARES; GONÇALVES, ANDREZA PARREIRAS; ALVES, PEDRO AUGUSTO; KROON, ERNA GEESIEN; CALZAVARA-SILVA, CARLOS EDUARDO; RAMALHO, DARIO BROCK; MARTINS-FILHO, OLINDO ASSIS; TEIXEIRA-CARVALHO, ANDREA; LABEAUD, A. DESIREE; DRUMOND, BETÂNIA PAIVA. Wild-type Yellow fever virus in cerebrospinal fluid from fatal cases in Brazil, 2018. Frontiers in Virology, v. 2, p. 2022.936191--, 2022. <https://doi.org/10.3389/fviro.2022.936191>

9. REFERÊNCIAS

ABDELNABI, Rana; NEYTS, Johan; DELANG, Leen. Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral research* v. 121, p. 59–68, set. 2015.

ALTHOUSE, Benjamin M. *et al.* Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. *Nature communications* v. 9, n. 1, p. 1046, 13 mar. 2018.

ANG, Swee Kim; LAM, Shirley; CHU, Justin Jang Hann. Propagation of Chikungunya Virus Using Mosquito Cells. *Methods in molecular biology* v. 1426, p. 87–92, 2016.

APANDI, Y. *et al.* The first isolation of chikungunya virus from nonhuman primates in Malaysia. *Journal of General and Molecular Virology*, v. 1, n. 3, p. 35-39, 2009.

ARRUDA, M. S. Investigação molecular da infecção por Mayaro vírus em primatas não humanos no estado de Minas Gerais (2017-2020) e otimização de teste de neutralização viral alternativo para investigação da infecção por mayaro vírus. Dissertação (Mestrado em microbiologia) - Programa de pós-graduação em microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, p.110. 2023.

AZAMI, Nor Azila Muhammad; MOI, Meng Ling; TAKASAKI, Tomohiko. Neutralization assay for chikungunya virus infection: Plaque reduction neutralization test. *Chikungunya virus: methods and protocols*, p. 273-282, 2016.

BAUER, M. RNA in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, v. 1, n. 1, p. 69-74, 2007.

BECK, Relja *et al.* Evaluation of ELISA for detection of *Trichinella* antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. *Veterinary parasitology*, v. 132, n. 1-2, p. 91-95, 2005.

BINN, L. N. *et al.* Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with chikungunya and other serologically related group A arboviruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 16, n. 6, p. 782-5, 1967.

Brodin, Petter, and Mark M. Davis. "Human immune system variation." *Nature reviews immunology* 17.1 (2017): 21-29.

BROECKEL, Rebecca *et al.* Nonhuman primate models of Chikungunya virus infection and disease (CHIKV NHP model). *Pathogens*, v. 4, n. 3, p. 662-681, 2015.

BROWN, Lawrence D.; CAI, T. Tony; DASGUPTA, Anirban. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical science*, v. 16, n. 2, p. 101-133, 2001.

CAGLIOTI, Claudia *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol*, v. 36, n. 3, p. 211-27, 2013.

CASTILLO-MACÍAS, A.; SALINAS-CARMONA, M. C.; TORRES-LÓPEZ, E. *Immunology of viral infections with a high impact in Mexico: Dengue, Chikungunya, and Zika*. Medicina Universitaria. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmu.2017.09.001>>. , 2018

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, dez. 2018.

CHUA, H. H. *et al.* A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement. *The Medical journal of Malaysia* v. 65, n. 1, p. 83–84, mar. 2010.

CLETON, Natalie *et al.* Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical*

Virology v. 55, n. 3, p. 191–203 , nov. 2012.

COUDERC, Thérèse *et al.* A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. PLoS pathogens v. 4, n. 2, p. e29 , 8 fev. 2008.

DA SILVA NEVES, Nilvanei Aparecido *et al.* Chikungunya, Zika, Mayaro, and Equine Encephalitis virus detection in adult Culicinae from South Central Mato Grosso, Brazil, during the rainy season of 2018. Brazilian Journal of Microbiology, p. 1-8, 2022.

DE FRANÇA CIRILO, Marcus Vinicius *et al.* Co-circulation of Chikungunya virus, Zika virus, and serotype 1 of Dengue virus in Western Bahia, Brazil. Frontiers in Microbiology, v. 14, p. 1240860, 2023.

DE LIMA CAVALCANTI, Thaise Yasmine Vasconcelos *et al.* A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. Viruses v. 14, n. 5 , 5 maio 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/v14050969>>.

DE LIMA, Shirlene Telmos Silva *et al.* Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America v. 73, n. 7, p. e2436–e2443 , 5 out. 2021.

DE MELO, Maria de Fátima Freire *et al.* Arbovirus expansion: New species of culicids infected by the Chikungunya virus in an urban park of Brazil. Acta Tropica, v. 209, p. 105538, 2020.

DE MORAIS ALVES BARBOSA OLIVEIRA, Rhaquel *et al.* Chikungunya Death Risk Factors in Brazil, in 2017: A case-control study. PloS one v. 17, n. 4, p. e0260939 , 7 abr. 2022.

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 , ago. 2018.

DE SOUZA COSTA, M. C. *et al.* Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015-2016. Acta tropica v. 190, p. 395–402 , fev. 2019.

DIALLO, M. *et al.* Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. The American journal of tropical medicine and hygiene v. 60, n. 2, p. 281–286 , fev. 1999.

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology v. 18, n. 1, p. 283–285 , jan. 2015.

Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. Journal of Statistical Software, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01

DUARTE, Marina HL; GOULART, Vinicius DLR; YOUNG, Robert J. Designing laboratory marmoset housing: What can we learn from urban marmosets?. Applied Animal Behaviour Science, v. 137, n. 3-4, p. 127-136, 2012.

DUBRULLE, Mathieu *et al.* Chikungunya virus and Aedes mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. PloS one, v. 4, n. 6, p. e5895, 2009.

DUNN, Jacob; CRISTÓBAL-AZKARATE, Jurgi. New World Monkeys

EASTWOOD, Gillian *et al.* Enzootic Circulation of Chikungunya Virus in East Africa: Serological Evidence in Non-human Kenyan Primates. The American journal of tropical medicine and hygiene v. 97, n. 5, p. 1399–1404 , nov. 2017.

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

ENDALE, Adugna *et al.* Community-based sero-prevalence of chikungunya and yellow fever in the South Omo Valley of Southern Ethiopia. *PLoS neglected tropical diseases* v. 14, n. 9, p. e0008549, set. 2020.

ENEH, Stanley Chinedu et al. Chikungunya outbreak in africa: A review of the literature. *Annals of Medicine and Surgery*, p. 10.1097, 2023.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. *Emergent arboviruses in Brazil*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822007000200016>>. , 2007

FILIPPE, A. F.; PINTO, M. R. Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus. *Bulletin of the World Health Organization* v. 49, n. 1, p. 37–40, 1973.

FRITSCH, Hegger *et al.* *Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil*. *Microbiology Spectrum*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01285-22>>. , 2022

FUMAGALLI, Marcilio Jorge *et al.* Chikungunya Virus Exposure Partially Cross-Protects against Mayaro Virus Infection in Mice. *Journal of virology* v. 95, n. 23, p. e0112221, 9 nov. 2021.

GALÁN-HUERTA, Kame Alberto et al. Chikungunya virus: A general overview. *Medicina universitaria*, v. 17, n. 68, p. 175-183, 2015.

GAMBLE, H. R.; PATRASCU, I. V. Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. *Journal of food protection*, v. 59, n. 11, p. 1213-1217, 1996.

GARCIA-OLIVEIRA, Gabriela F. et al. YELLOW ALERT: Persistent Yellow Fever Virus Circulation among Non-Human Primates in Urban Areas of Minas Gerais State, Brazil (2021–2023). *Viruses*, v. 16, n. 1, p. 31, 2023.

GAROFF, H.; SJÖBERG, M.; CHENG, R. H. Budding of alphaviruses. *Virus Research*, v. 106, n. 2, p. 103–116, dez. 2004.

GOUPIL, Brad A. *et al.* Novel Lesions of Bones and Joints Associated with Chikungunya Virus Infection in Two Mouse Models of Disease: New Insights into Disease Pathogenesis. *PloS one* v. 11, n. 5, p. e0155243, 16 maio 2016.

HARRISON, V. R.; MARSHALL, J. D.; GUILLOUD, N. B. The presence of antibody to chikungunya and other serologically related viruses in the sera of sub-human primate imports to the United States. *The Journal of Immunology*, v. 98, n. 5, p. 979-981, 1967.

HERNÁNDEZ-AGUILAR, Itandehui et al. Molecular Detection of Dengue Virus, Zika Virus, and Chikungunya Virus Arboviruses in Neotropical Bats. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 23, n. 8, p. 428-436, 2023.

HIGGS, Stephen et al. A nonhuman primate model of chikungunya disease. *The Journal of clinical investigation*, v. 120, n. 3, p. 657-660, 2010.

HOLLAND, John J.; MCLAREN, Leroy C. THE MAMMALIAN CELL-VIRUS RELATIONSHIP. *Journal of Experimental Medicine*, [S. l.], v. 109, n. 5, p. 487–504, 1959. ISSN: 1540-9538. DOI: 10.1084/jem.109.5.487. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/109/5/487/2633/THE-MAMMALIAN-CELLVIRUS-RELATIONSHIP->

II-ADSORPTION.

HONÓRIO, Nildimar Alves; CÂMARA, Daniel Cardoso Portela; CALVET, Guilherme Amaral. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil Chikungunya: una arbovirosis en establecimiento y. Cad. Saúde Pública, v. 31, n. 5, p. 1-3, 2015.

HOUSELEY, Jonathan; TOLLERVEY, David. The many pathways of RNA degradation. Cell, v. 136, n. 4, p. 763-776, 2009.

INOUE, S. *et al.* Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. Journal of medical primatology v. 32, n. 2, p. 89-94 , abr. 2003.

KAUR, Parveen; LEE, Regina Ching Hua; CHU, Justin Jang Hann. Infectious Viral Quantification of Chikungunya Virus—Virus Plaque Assay. Methods in Molecular Biology. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2_9>. , 2016

KROKOVSKY, Larissa et al. Arbovirus Surveillance in Field-Collected Mosquitoes From Pernambuco-Brazil, During the Triple Dengue, Zika and Chikungunya Outbreak of 2015-2017. Frontiers in Tropical Diseases, v. 3, p. 875031, 2022.

KUHN, R. J. Togaviridae. In: Fields Virology. 6^a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 629-646.

KUNO, Goro *et al.* *Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality?* .Viruses. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/v9070185>>. , 2017

LABADIE, Karine et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. The Journal of clinical investigation, v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010.

LAI, Alessia; TAMBUZZI, Stefano; BERGNA, Annalisa. Evidence of SARS-CoV-2 antibodies and RNA on autopsy cases in the pre-pandemic period in Milan (Italy). Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 886317, 2022.

LEUNG, Jason Yat-Sing; NG, Mary Mah-Lee; CHU, Justin Jang Hann. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. Advances in virology, v. 2011, 2011.

LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. *Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil* .Revista Pan-Amazônica de Saúde. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232014000300007>>. , 2014

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

MAGALHAES, Tereza *et al.* The Endless Challenges of Arboviral Diseases in Brazil. Tropical medicine and infectious disease v. 5, n. 2 , 9 maio 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed5020075>>.

MARCHETTE, N. J. *et al.* Alphaviruses in Peninsular Malaysia: I. Virus isolations and animal serology. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health v. 9, n. 3, p. 317-329 , set. 1978.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53; an additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene v. 51, n. 3, p. 238-240 , maio 1957.

MATUSALI, Giulia *et al.* Tropism of the Chikungunya Virus. *Viruses* v. 11, n. 2, 20 fev. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/v11020175>>.

MCINTOSH, B. M. Antibody against Chikungunya virus in wild primates in Southern Africa. *The South African journal of medical sciences* v. 35, n. 3, p. 65–74, dez. 1970.

MEJÍA, Carla-Ruth; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Tropical arthritogenic alphaviruses. *Reumatologia clinica* v. 14, n. 2, p. 97–105, mar. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Primatas Não Humanos E Entomologia. [S.l: s.n.], 2014a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil. [S.l: s.n.] 2014b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Boletim Epidemiológico de monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e zika vírus. 2017. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/Epidemiologia/Boletins_Dengue/Boletim_Aedes_04.12.17_IMP_RENSA.pdf. Acesso em: 13 março. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 50, 2020, [s. l.], 2020a. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf/view. Acesso em: 2 set. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021, [s. l.], 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico-vol-52-no-48.pdf/view. Acesso em: 2 set. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Boletim Epidemiológico. ARBOVIROSES URBANAS (DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA), [s. l.], 2022. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/1_noticias/09_2021/01_jan-fev-marc/Boletim%20Arboviroses_ARBO252.pdf. Acesso em: 2 set. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Situação epidemiológica da febre amarela no Monitoramento 2019/2020, [s. l.], 2020b. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim_epidemiologico_svs_46.pdf/view. Acesso em: 1 set. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. Boletim Epidemiológico. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Febre Chikungunya e Febre Zika. Nº 19, Semana Epidemiológica 20, 17/05/2016. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2016/2-abr-mai-jun/Boletins/Boletim_17-05-2016_rea%20cnica%20PDF.pdf. Acesso em: 10 out. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. Boletim Epidemiológico. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika. Nº 81, Semana Epidemiológica 51, Data da atualização: 18/12/2017. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2017/Boletins_AEDES/Boletim_Aedes_REA%20TCNICA_18-12-2017.pdf. Acesso em: 10 out. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023, [s. l.], 2020b.

Disponível em:

https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim_epidemiologico_svs_46.pdf/view. Acesso em: 19 março 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. Boletim Epidemiológico. Boletim epidemiológico de arboviroses urbanas (dengue, chikungunya e zika). Nº 307, Semana Epidemiológica 04/24, Data da atualização: 29/01/2024. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/images/1_noticias/05_2024/04-jan-marc-abril/29-01-BO_ARBO307.pdf. Acesso em: 19 mar. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Chikungunya. [sd]

MONGKOL, Nanthanida et al. Seroprevalence of Chikungunya and Zika virus in nonhuman primates: A systematic review and meta-analysis. *One Health*, p. 100455, 2022.

MOREIRA-SOTO, Andres *et al.* *Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil*. mSphere. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00523-17>>. , 2018

MORRISON, Thomas E. Reemergence of chikungunya virus. *Journal of virology* v. 88, n. 20, p. 11644–11647 , out. 2014.

MURILLO-ZAMORA, Efrén *et al.* Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* v. 41, p. e72 , 8 jun. 2017.

NAHM, Francis Sahngun. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean journal of anesthesiology*, v. 75, n. 1, p. 25, 2022.

NAKGOI, Khajornpong *et al.* Dengue, Japanese encephalitis and Chikungunya virus antibody prevalence among captive monkey (*Macaca nemestrina*) colonies of Northern Thailand. *American journal of primatology* v. 76, n. 1, p. 97–102 , jan. 2014.

NITATPATTANA, Narong et al. Long-term persistence of Chikungunya virus neutralizing antibodies in human populations of North Eastern Thailand. *Virology journal*, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2014.

NORET, Marion *et al.* *Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts*. *The Journal of infectious diseases*. [S.l: s.n.]. , 1 ago. 2012

NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine* v. 13, p. 102 , 30 abr. 2015.

OIDTMAN, Rachel J.; ESPAÑA, Guido; PERKINS, T. Alex. Co-circulation and misdiagnosis led to underestimation of the 2015-2017 Zika epidemic in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases* v. 15, n. 3, p. e0009208 , mar. 2021.

OLIVEIRA, G. F. G. Investigação molecular do vírus da febre amarela em primatas não humanos do estado de Minas Gerais (2017, 2021-2022) e adaptação de teste de neutralização para o vírus da febre amarela. Dissertação (Mestrado em microbiologia) - Programa de pós-graduação em microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, p.111. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Organização Pan-Americana de Saúde. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2015 (to week noted). [S. l.], 2016. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-cha-CHIKV-cumulative-cases-update.pdf>. Acesso em: 1 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Organização Pan-Americana de Saúde. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2013-2014. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-may-15-cha-CHIKV-cumulative-cases.pdf>. Acesso em: 1 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Organização Pan-Americana de Saúde. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2017. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-dec-22-phe-CHIKV-cases-ew-51.pdf>. Acesso em: 1 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Organização Pan-Americana de Saúde. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2013-2014. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-may-15-cha-CHIKV-cumulative-cases.pdf>. Acesso em: 1 set. 2022.

OSTERRIETH, P.; RATHE, E.; DELEPLANQUE-LIEGEOIS, P. [Simultaneous isolation of the yellow fever and Chikungunya viruses at Bili (Haut-Uele, Belgian Congo)]. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* v. 41, p. 207–212, 30 jun. 1961.

PAGLIA, Adriano P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. *Occasional papers in conservation biology*, v. 6, p. 1-82, 2012.

PAL, Pankaj et al. Chikungunya viruses that escape monoclonal antibody therapy are clinically attenuated, stable, and not purified in mosquitoes. *Journal of virology*, v. 88, n. 15, p. 8213-8226, 2014.

PAUL, S. D. et al. Experimental infection of *Macaca radialis* with chikungunya virus and transmission of virus by mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research*, v. 56, n. 6, p. 802-11, 1968.

PINTO, Sofia B. et al. Effectiveness of Wolbachia-infected mosquito deployments in reducing the incidence of dengue and other Aedes-borne diseases in Niterói, Brazil: A quasi-experimental study. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 15, n. 7, p. e0009556, 2021.

POWERS, Ann M.; LOGUE, Christopher 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.

POWERS, Ann M. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clinical microbiology reviews* v. 31, n. 1, jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00104-16>.

RAJAPAKSE, Senaka; RODRIGO, Chathuraka; RAJAPAKSE, Anoja. Atypical manifestations of chikungunya infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v. 104, n. 2, p. 89–96, fev. 2010.

RASULOVA, Madina et al. A High-Throughput Yellow Fever Neutralization Assay. *Microbiology Spectrum*, [S. l.], v. 10, n. 3, 2022. ISSN: 2165-0497. DOI: 10.1128/spectrum.02548-21. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.02548-21>.

RAUT, C. G. *et al.* Chikungunya, dengue, and malaria co-infection after travel to Nigeria, India. *Emerging infectious diseases* v. 21, n. 5, p. 908–909, maio 2015.

REZENDE, Izabela Maurício De *et al.* Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS neglected tropical diseases* v. 12, n.

6, p. e0006538 , jun. 2018.

REZENDE, Izabela Maurício de et al. Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. *Vaccines*, v. 7, n. 4, p. 206, 2019.

RIBEIRO CRUZ, Ana Cecília et al. Chikungunya virus Detection in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* during an Outbreak in the Amazon Region. *Viruses*, v. 12, n. 8, p. 853, 2020.

RODRIGUES FARIA, Nuno *et al.* Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. *PLoS currents* v. 8 , 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2>>.

Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 2008 Jun;21(2):123-32. doi: 10.1089/vim.2008.0007. PMID: 18476771.

RUFALCO-MOUTINHO, Paulo et al. Evidence of co-circulation of multiple arboviruses transmitted by *Aedes* species based on laboratory syndromic surveillance at a health unit in a slum of the Federal District, Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 14, p. 1-13, 2021.

SACCHETTO, Livia *et al.* Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* v. 14, n. 10, p. e0008658 , out. 2020.

SAM, I-Ching *et al.* Chikungunya Virus in Macaques, Malaysia. *Emerging infectious diseases* v. 21, n. 9, p. 1683–1685 , set. 2015.

SAMPAIO-SILVA, Fernanda et al. Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem interval. *PloS one*, v. 8, n. 2, p. e56507, 2013.

SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L. *Biology and pathogenesis of chikungunya virus* .Nature Reviews Microbiology. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2368>> . , 2010

SEGATA, Jean. Chikungunya in Brazil, an endless epidemic. *Centaurus; international magazine of the history of science and medicine* v. 64, n. 1, p. 133–144 , jun. 2022.

SILVA, José V. J., Jr *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta tropica* v. 188, p. 213–224 , dez. 2018.

SILVA, Natalia Ingrid Oliveira *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology journal* v. 17, n. 1, p. 9 , 23 jan. 2020.

SIMÕES, Marisol et al. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals*, v. 40, n. 6, p. 399-404, 2012.

SIMON, Fabrice *et al.* Chikungunya virus infection. *Current infectious disease reports* v. 13, n. 3, p. 218–228 , jun. 2011.

DE SOUZA, William M. et al. Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. *The Lancet Microbe*, v. 4, n. 5, p. e319-e329, 2023.

THIBOUTOT, Michelle M. *et al.* Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS neglected tropical diseases* v. 4, n. 4, p. e623 , 27 abr. 2010.

TIMIRYASOVA, Tatyana M. et al. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization

test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 88, n. 5, p. 962, 2013.

TONGTHAINAN, Daraka *et al.* Seroprevalence of dengue, Zika, and chikungunya viruses in wild monkeys in Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 103, n. 3, p. 1228, 2020.

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

TSETSARKIN, Konstantin A. *et al.* A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens* v. 3, n. 12, p. e201, dez. 2007.

VAN DUIJL-RICHTER, Mareike K. S. *et al.* Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses* v. 7, n. 7, p. 3647–3674, 7 jul. 2015.

VASCONCELOS, Pedro F. C.; POWERS, Ann M.; HILLS, Susan. The emergence of Chikungunya and Zika viruses in the Americas. *Chikungunya and Zika Viruses*. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 215–235. 9780128118658.

VEGA-RÚA, Anubis *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of virology* v. 88, n. 11, p. 6294–6306, jun. 2014.

Vero | ATCC. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/ccl-81>>.

VOSS, James E. *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2 dez. 2010.

WAGGONER, Jesse J. *et al.* Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* v. 63, n. 12, p. 1584–1590, 15 dez. 2016.

WAHID, Braira *et al.* Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* v. 58, p. 69–76, maio 2017.

WEAVER, Scott C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS neglected tropical diseases* v. 8, n. 6, p. e2921, jun. 2014.

WEAVER, Scott C.; FORRESTER, Naomi L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral research*, v. 120, p. 32-39, 2015.

WEGER-LUCARELLI, James *et al.* Identifying the Role of E2 Domains on Alphavirus Neutralization and Protective Immune Responses. *PLoS neglected tropical diseases* v. 9, n. 10, p. e0004163, 16 out. 2015.

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. [s.l.] : Springer-Verlag New York, 2016. ISBN: 978-3-319-24275-0.

WILDER-SMITH, Annelies *et al.* Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *The Lancet infectious diseases* v. 17, n. 3, p. e101–e106, mar. 2017.

WOLFE, N. D. *et al.* Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerging infectious diseases* v. 4, n. 2, p. 149–158, abr. 1998.

WILSON, Edwin B. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. Journal of the American Statistical Association, v. 22, n. 158, p. 209-212, 1927.

YACTAYO, Sergio *et al.* *Epidemiology of Chikungunya in the Americas* .Journal of Infectious Diseases. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw390>>. , 2016

ZANOTTO, Paolo Marinho de Andrade; LEITE, Luciana Cezar de Cerqueira. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. Frontiers in immunology v. 9, p. 1964 , 28 ago. 2018.

ZARNKE, Randall L. et al. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. Journal of Wildlife Diseases, v. 37, n. 1, p. 36-38, 2001.

10. ANEXOS

ANEXO A - Documentos CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

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

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

Considerações posteriores:

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

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

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

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

Considerações posteriores:

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

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

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

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

Anexo B – Publicações em periódicos



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gerald Misirzo,
Sokoine University of Agriculture,
Tanzania

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

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

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

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

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

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

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

Izabela Mauricio de Rezende^{1,2*},
Adriana Regina Campolina Cenachi³, Thais Alkifeles Costa¹,
Gabriela Fernanda Garcia Oliveira¹, Livia Rabelo³,
Leticia Mattos Menezes^{3†}, Indiara Penido³,
Leonardo Soares Pereira^{3,4}, Matheus Soares Arruda¹,
Andreza Parreiras Gonçalves⁵, Pedro Augusto Alves⁵,
Erna Geessien Kroon¹, Carlos Eduardo Calzavara-Silva⁶,
Dario Brock Ramalho⁷, Olindo Assis Martins-Filho⁸,
Andrea Teixeira-Carvalho⁸, A. Desiree LaBeaud²
and Betânia Paiva Drumond^{1*}

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

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

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

KEYWORDS

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

Introduction

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

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

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

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

Methodology

Biological samples and ethics

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

YFV investigation

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

YFV genotyping

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

Serological analysis

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

Laboratory exams

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

Statistical analysis

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

Results

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

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

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

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

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

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

GENERAL DATA		ID	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13
		AGE	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male
		SEX	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive	reactive
		anti-YFV IgM (CSF)	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
		YFV VACCINE RECORD	2001												
Admission day	DPS		6	13	4	1	5	3	5	11	2	3	3	3	2
Death day			9	25	*	6	9	7	*	41	8	4	9	6	7
Admission day	Fever		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Death day			A	A	*	0	P	A	*	n/a	A	A	A	A	A
Admission day	Headache		P	P	A	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P
Death day			0	0	*	A	A	A	*	n/a	A	A	A	A	A
Admission day	Confusion		P	P	A	0	P	A	A	P	A	P	P	A	A
Death day			0	P	*	A	A	A	*	n/a	P	A	A	P	A
Admission day	Seizure		P	A	A	0	0	A	A	A	A	P	P	A	A
Death day			A	A	*	0	0	A	*	n/a	A	A	A	P	P
Admission day	Other neurological disorder		coma	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Death day			coma	coma	*	coma	coma	A	*	n/a	A	coma	A	A	A
Admission day	Jaundice		P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P
Death day			P	P	*	A	P	A	*	n/a	P	A	P	A	A
Admission day	Platelets		34,000	87,000	86,000	55,000	162,000	62,000	55,000	61,000	96,000	10,100	40,000	46,000	81,000
Death day	(150,000 – 400,000 mm ³)		75,000	67,000	*	59,000	89,000	57,000	*	67,000	109,000	67,000	47,000	70,000	57,000
Admission day	Neutrophils		7,458	7,544	4,556	1,200	13,600	4,712	3,016	1,872	1,098	3,844	3,996	5,472	n/a
Death day	(2,000 – 8,250 mm ³)		n/a	n/a	*	n/a	n/a	n/a	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Admission day	Creatinine		7.2	1	4.7	1	8.1	4.4	5.2	1.9	1.4	1.3	0.6	5.7	1.7
Death day	(0.7 – 1.30 mg/dL)		6.8	5.5	*	5.6	5.6	6.1	*	4.9	5.6	5.9	4.4	4.7	4.6
Admission day	Albumin		2.7	1.9	n/a	2.9	3	2.5	2.6	2.5	3.6	2.8	3.3	2.1	3.2
Death day	(3.4 – 4.5 g/dL)		2.2	2.4	*	2.8	n/a	2.5	*	2.4	2.4	2.4	3.2	2.1	3.4
Admission day	AST		14,080	231	430	7,491	17,000	6,674	8,369	7,630	4	5,475	7,679	19,000	13,437
Death day	(10 – 40 U/L)		4,019	574	*	14,928	4,943	4,807	*	120	7,289	15,098	5,141	4,728	9,228
Admission day	ALT		5,683	668	3,800	5,029	13,544	4,417	4,000	2,390	4,227	176	5,059	4,708	6,178
Death day	(10 – 40 U/L)		1,896	171	*	5,790	2,735	2,376	*	52	131	2,049	3,705	878	2,334
Admission day	TbIL		7.2	21.7	5	2.9	4.9	13.6	6.8	9.9	1.7	5.6	4.8	6.3	2.8
Death day	(0.3 – 1.0 mg/dL)		7.4	n/a	*	13.3	6.9	18.1	*	29.4	14.5	5.6	16.7	4.7	10.1
Admission day	DbIL		6.7	19.7	2.2	2.2	3.2	13	6.5	8.6	1.3	5.6	3.7	5.9	2.3
Death day	(0.1 – 0.3 mg/dL)		6.4	29.9	*	12	3.1	17.4	*	26	13.9	3.8	14.2	4.3	8.6
Admission day	GGT		210	172	n/a	151	n/a	422	165	397	82	169	661	189	n/a

(Continued)

TABLE 2 Continued
GENERAL DATA

ID	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13
	24	54	62	45	41	80	55	55	64	27	46	56	68
	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male	male
	reactive	reactive	NR	reactive	NR	reactive	reactive	reactive	reactive	NR	reactive	NR	n/a
	2001	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Death day	156	126	n/a	194	164	346	*	108	131	96	188	116	186
Admission day	158	109	n/a	120	234	215	77	187	84	n/a	68	109	n/a
Death day	254	199	n/a	394	982	206	*	224	121	147	98	104	212
Admission day	3.99	1.78	4.82	2.39	9.27	1.47	1.59	2.01	1.82	6	1.57	1.89	1.31
Death day	2.86	1.69	*	4.61	> 5.00	1.15	*	1.17	n/a	3.4	2.95	1.97	1.58

*Data from admission and death day are the same. P 1–P 13, patient 1 to 13. DPS, days post symptom onset; NR, non-reactive; n/a, not available; NV, non-vaccinated; P, presence; A, absence; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; Tbil, Total bilirubin; Dbil, Direct bilirubin; CDT, gamma-glutamyl transferase; APbox, alkaline phosphatase; INR, international normalized ratio. Laboratory test reference ranges followed ABIM (16).

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

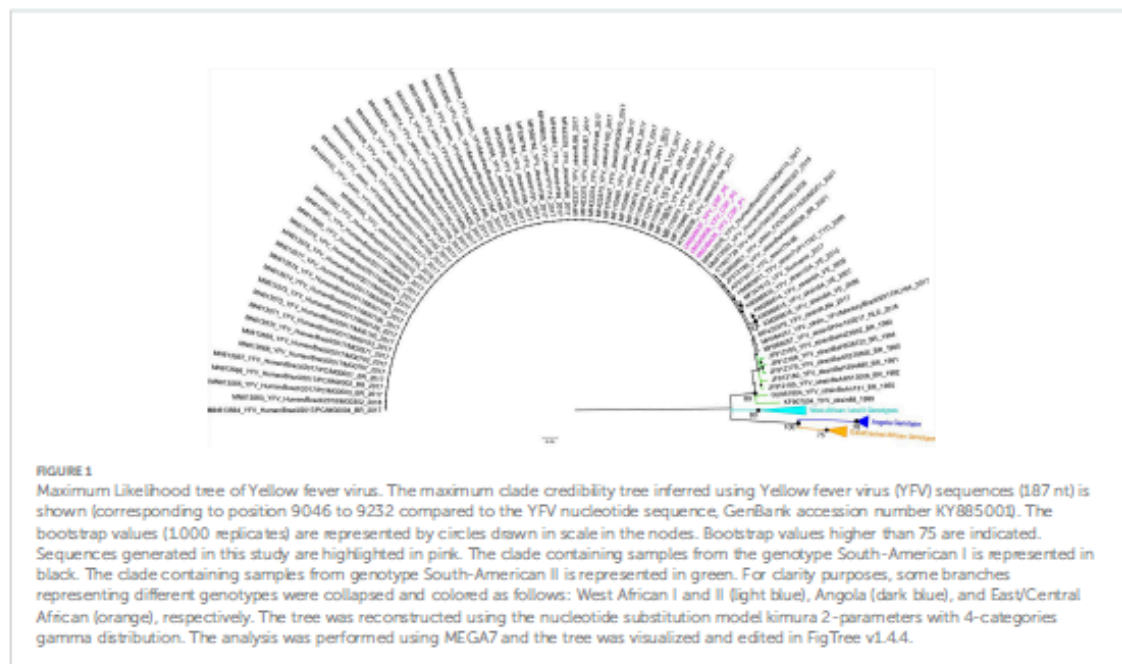
Among the 13 CSF samples, 12 were tested using an IgM anti-YFV immunochromatographic test, and eight were IgM positive (Table 2). We could not run this test using CSF sample from P #13, due to insufficient quantity. Samples that had YFV RNA detected in CSF and were IgM reactive (P #1, P #2, P #4), were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

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

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

Discussion

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



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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

Data availability statement

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

Ethics statement

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

Author contributions

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

Funding

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

Conflict of interests

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

Publisher's note

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

References

- Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* (2001) 1:11–20. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00016-0
- Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. Re-emergence of yellow fever in the neotropics — quo vadis? *Emerg Top Life Sci* (2020) 4:411–22. doi: 10.1042/ETLS20200187
- Kallas BG, D'Elia Zanella L, G. F. A. B., Moreira CHV, Buccheri R, Diniz GBF, Castineiras ACP, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* (2019) 19:750–8. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30125-2
- Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade GDS, Labeaud AD, De Thois B, et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Viral J* (2020) 17:1–12. doi: 10.1186/s12985-019-1277-7
- Hadjilambi A, Arias N, Sheikh M, Jalan R. Hepatic encephalopathy: a critical current review. *Hepatol Int* (2018) 12:135–47. doi: 10.1007/s12072-017-9812-3
- Beck AS, Barrett AD. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert Rev Vaccines* (2015) 14:1479–92. doi: 10.1586/14760584.2015.1083430
- MS-BR. *Manual de manejo clínico da febre amarela*. 1st ed. (2020), Brasília.
- McEntire CRS, Song K-W, McInnis RP, Rhee JY, Young M, Williams E, et al. Neurologic manifestations of the world health organization's list of pandemic and epidemic diseases. *Front Neurol* (2021) 12:634827. doi: 10.3389/fneur.2021.634827
- Marinho PES, Alvarenga PPM, Crispim APC, Candiani TMS, Alvarenga AM, Bechler IM, et al. Wild-type yellow fever virus rna in cerebrospinal fluid of child. *Emerg Infect Dis* (2019) 25:1567–70. doi: 10.3201/eid2508.181479
- Ribeiro AF, Cavalin RF, Saleiman JMAH, Da Costa JA, De Vasconcelos MJ, Málague CMA, et al. Yellow fever: Factors associated with death in a hospital of reference in infectious diseases, São Paulo, Brazil 2018. *Am J Trop Med Hyg* (2019) 101:180–8. doi: 10.4269/ajtmh.18-0882
- Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol* (2013) 12:906–19. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70150-9
- Suthar MS, Diamond MS, Gale. West Nile Virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* (2013) 11:115–28. doi: 10.1038/nrmicro2950
- Oliveira DB, Machado G, de Almeida GMF, Ferreira PCP, Bonjardim CA, de Trindade GS, et al. Infection of the central nervous system with dengue virus 3 genotype 1 causing neurological manifestations in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* (2016) 49:125–9. doi: 10.1590/0037-8682-0208-2015
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med* (2016) 374:1552–63. doi: 10.1056/NEJMa1602113
- Li G-H, Ning Z-J, Liu Y-M, Li X-H. Neurological manifestations of dengue infection. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:449. doi: 10.3389/fcimb.2017.00449
- Maximova OA, Pletnev AG. Flaviviruses and the central nervous system: Revisiting neuropathological concepts. *Annu Rev Virol* (2018) 5:255–72. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043439
- Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, de Oliveira Lucas CG, Mustafá YM, Matassoli FL, et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. *Front Microbiol* (2017) 8:2557. doi: 10.3389/fmicb.2017.02557
- Daniels B, Klein R. Viral sensing at the blood-brain barrier: New roles for innate immunity at the CNS vasculature. *Clin Pharmacol Ther* (2015) 97:372–9. doi: 10.1002/cpt.75
- Absinta M, Ha S-K, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Pallisoc M, et al. Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife* (2017) 6:e29738. doi: 10.7554/eLife.29738
- Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Mendez JA, Nakoune ER, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol* (2012) 50:4054–60. doi: 10.1128/JCM.01799-12
- Rezende IM, Alves PA, Arruda MS, Gonçalves AP, Oliveira GFG, Pereira LS, et al. Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. *Vaccines* (2019) 7:1–10. doi: 10.3390/vaccines7040206
- Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Viral J* (2013) 10:58. doi: 10.1186/1743-422X-10-58
- Sanger F, Nicklen S. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) 74:5463–7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* (2016) 33:1870–4. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Wieten RW, Jonker EFF, Pieren DKJ, Houdmont CJ, van Thiel PPAM, van Gorp ECM, et al. Comparison of the PRNT and an immune fluorescence assay in yellow fever vaccinees receiving immunosuppressive medication. *Vaccine* (2016) 34:1247–51. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.037
- ABIM. *Laboratory test reference ranges* (2020). Available at: <https://www.abim.org/-/media/ABIM%20Public/Files/pdf/exam/laboratory-reference-ranges.pdf> (Accessed January 13, 2020).
- Stevenson LD. Pathologic changes in the nervous system in yellow fever. *Arch Pathol* (1939) 27:349–66.
- Monath TP, Barrett ADT. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. (2003) 60:3527. doi: 10.1016/S0065-3527(03)60009-6
- Puccioni-Sohler M, Rosadas C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arq Neuropsiquiatr* (2015) 73:698–703. doi: 10.1590/0004-282X20150074
- Neal JW. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *J Infect* (2014) 69:203–15. doi: 10.1016/j.jinf.2014.05.010

COPYRIGHT

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



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

Ízabela Maurício de Rezende,^{a,b} Gabriela Fernanda Garcia Oliveira,^a Thaís Alkifeles Costa,^a Aslam Khan,^b Leonardo Soares Pereira,^{a,c} Tayrine Araújo Santos,^c Pedro Augusto Alves,^d Carlos Eduardo Calzavara-Silva,^e Olindo Assis Martins-Filho,^f Andréa Teixeira-Carvalho,^f Angelle Desirée LaBeaud,^b Betânia Paiva Drumond^a

^aLaboratory of Viruses, Microbiology Department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bDepartment of Pediatrics, Division of Infectious Disease, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA

^cEduardo de Menezes Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^dImmunology of Viruses Diseases, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^eCellular and Molecular Immunology, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^fIntegrated Group of Biomarkers Research, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

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

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

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

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

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

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

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

The authors declare no conflict of interest.

Received 4 March 2022

Returned for modification 9 May 2022

Accepted 28 June 2022

Published 2 August 2022

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

Biological samples and ethics. A total of 480 patients were attended at Eduardo de Menezes Hospital (HEM), Belo Horizonte, Brazil, a reference hospital for infectious diseases in Minas Gerais state, during the 2017 to 2018 YF outbreak. Routine YF laboratory diagnosis tests (PCR or ELISA) were performed at Reference Laboratory in Minas Gerais (Ezequiel Dias Foundation—FUNED). The YF laboratory diagnosis was confirmed through positive YFV PCR or detection of anti-YFV IgM, followed by negative anti-DENV and anti-ZIKV IgM tests. Of the 302 patients with confirmed YF, 60 patients provided consent and urine samples for the current study. Urine samples from the 60 patients enrolled in this study were obtained in different DPS (Table 1) and analyzed. One urine sample per patient was analyzed, and whenever available, serum samples were also analyzed (Table 1). Twenty-seven urine samples were collected during the YF acute phase (up to 15 DPS), and 33 urine samples were obtained during the convalescent phase (from 19 to 94 DPS) (Table 1). Urine and serum samples were collected at the hospital and kept in liquid nitrogen until adequate transport to Virus Laboratory/ICB/UFMG, where the samples were maintained in an ultra-freezer at -70°C until use. Out of 60 patients enrolled in the study, 58 patients had no record of YF vaccination, while two patients had been vaccinated against YF 10 days before symptom onset. This study was approved by the Ethics Committee for studies with human subjects on Human Research at René Rachou Institute/FIDCRUZ-MG on CAAE 65814417.000005091 and CAAE 43000815.700005091.

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

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

Data availability. Sequence data generated in this study were deposited in GenBank under accession numbers OM692343 to OM692349.

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

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

(Continued on next page)

TABLE 1 (Continued)

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

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

^bYFV diagnosis confirmed by Central Reference Laboratory (FUNED) linked to Ministry of Health and Health Secretary of Minas Gerais state.

^cDate of exam's result is not available; however, the positive YF case was confirmed.

RESULTS

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

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

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

DISCUSSION

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

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

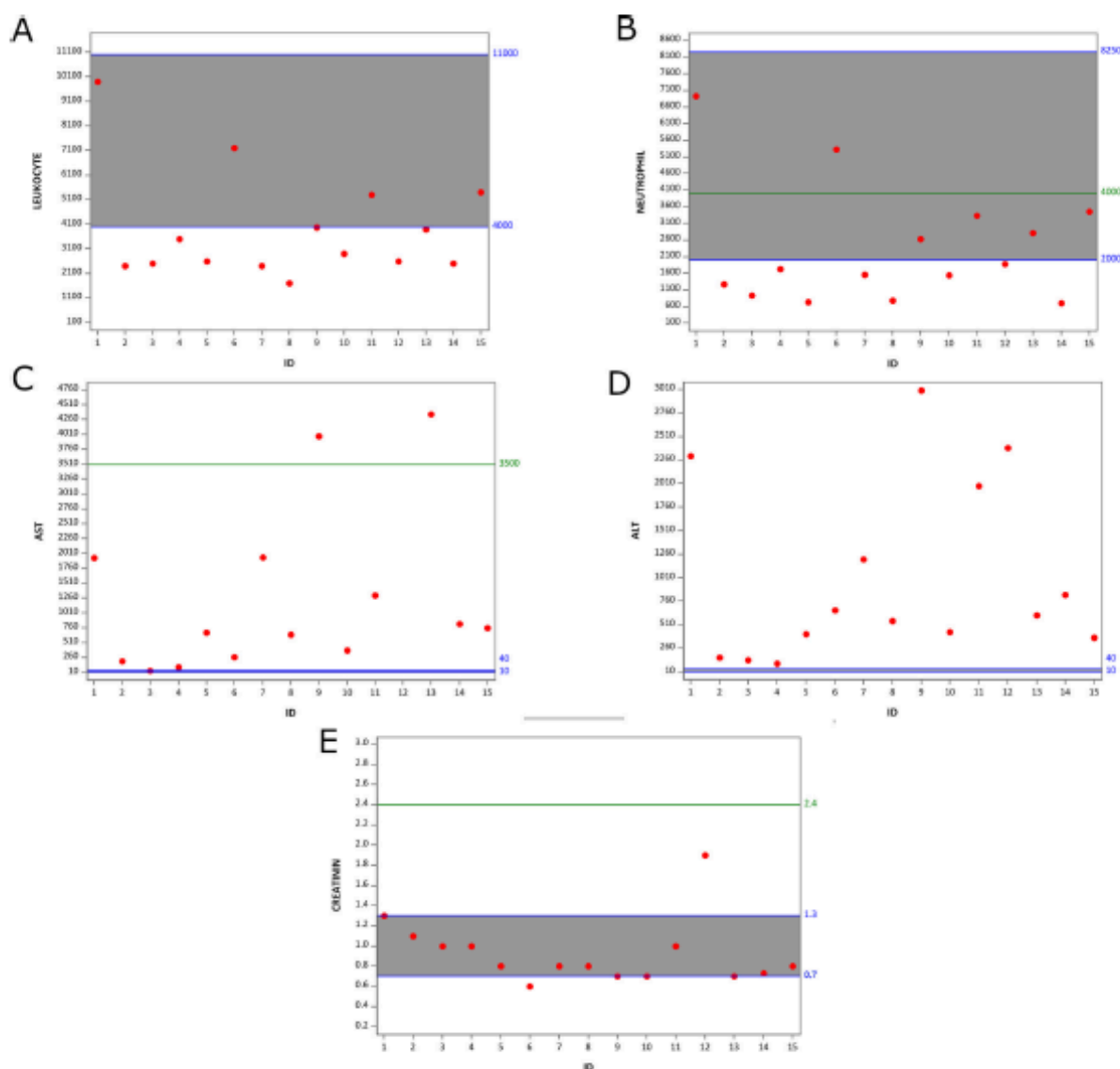


FIG 1 Plot of laboratory exams values of patients from whom YFV RNA were detected in urine samples. Shown here are leukocyte count (mm³) (A), neutrophil count (mm³) (B), ALT (U/L) (C), AST (U/L) (D), and creatinine (mg/dL) (E). Normal range values are shown between blue lines and highlighted in gray. The cutoff described by Kallas et al. (2019) for developing severe YF disease is represented by the green line. Data from P2, P3, P4, P5, P7, P8, and P13 were collected 3 DPS. Data from P9 and P14 were collected 5 DPS. Data from P10 and P11 were collected 6 DPS. Data from P1, P6, and P15 were collected 7 DPS. Data from P12 were collected 11 DPS. The y axis indicates the values of different biomarkers. Red dots indicate the measure of each patient according to the patient ID plotted in x axis.

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

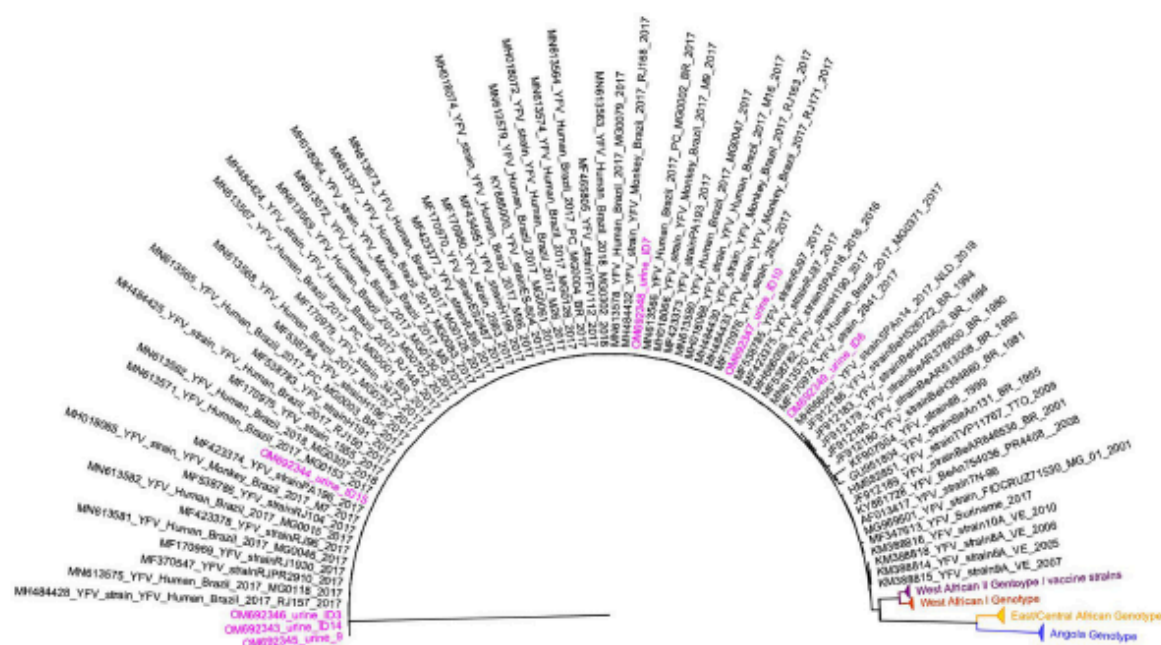


FIG 2 Maximum likelihood tree of yellow fever virus. The maximum clade credibility tree inferred using yellow fever virus (YFV) sequences (213 nt) is shown (corresponding to position 9020 to 9232 compared to the nucleotide sequence of YFV-17D, GenBank accession number: X03700). The bootstrap values (1,000 replicates) are represented by circles drawn in scale in the nodes. Sequences generated in this study are highlighted in pink. The clade containing samples from genotype South American I is represented in black. For clarity purposes, some branches representing different genotypes were collapsed and colored as follows: West African II/vaccine strains (purple), West African I (red), East/Central African (yellow), and Angola (blue). The tree was reconstructed using the nucleotide substitution model kimura 2-parameters with 4-categories gamma distribution. The analysis was performed using MEGA5 and the tree visualized and edited in FigTree v1.4.4.

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

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

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

We have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Maguire HCF, Heymann DL. 2016. Yellow fever in Africa. *Bmj* 3764. <https://doi.org/10.1136/bmj.3764>.
- Song R, Guan S, Lee SS, Chen Z, Chen C, Han L, Xu Y, Li A, Zeng H, Ye H, Zhang F. 2018. Late or lack of vaccination linked to importation of yellow fever from Angola to China. *Emerg Infect Dis* 24:1383–1386. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171868>.
- PAHO. 2019. Yellow fever epidemiological report. The Pan American Health Association.
- Silva NIQ, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade GDS, Labaud AD, De Thois B, Drumond BP. 2020. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Viro J* 17:9–12. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>.
- Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilek N. 2020. Re-emergence of yellow fever in the neotropics—quo vadis? *Emerg Top Life Sci* 4: 399–410. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200187>.
- Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, Staples JE, Tomori O, Wilder-Smith A, Monath TP. 2011. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis* 11:622–632. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70147-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70147-5).
- Monath TP. 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 1:11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0).
- Rezende IM, Pereira LS, Barbosa Fradico JR, Pascoal Xavier MA, Alves PA, Campi-Azevedo AC, Spezia E, Moreira dos Santos LZ, Albuquerque NS, Penido I, Santos TA, Dinis Anjo Born AP, Vieira da Silva AM, Fernandes CB, Calzavara CE, Kroon EG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Drumond BP. 2020. Late-relapsing hepatitis after yellow fever. *Viruses* 12:222–230. <https://doi.org/10.3390/v12020222>.
- Casadio L, Nastro AC, Malta FM, Araújo J, Silva JB, Salomao J, Yamashiro J, Salles AP, Gouveia MG, Kanamura C, Lima FR, Tanigawa RY, Melo ES, Lima R, Terabulo D, Cançado E, Ho Y-L, Sabino EC, Pinho JR, Carilho FJ, Alves VA, Levin AS. 2020. Late-onset relapsing hepatitis associated with yellow fever. *N Engl J Med* 382:2059–2061. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1913036>.
- Denis B, Chirio D, Ponscarre D, Brichier S, Collin de Verdière N, Simon F, Molina J-M. 2019. Hepatitis rebound after infection with yellow fever virus. *Emerg Infect Dis* 25:1248–1249. <https://doi.org/10.3201/eid2506.190069>.
- Francis TJ, Moore DL, Edington GM, Smith JA. 1972. A clinicopathological study of human yellow fever. *Bull World Health Organ* 46:659–667.
- WHO. 2020. Yellow fever. World Health Organization.
- PAHO/WHO. 2018. Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus Infection. The Pan American Health Association and World Health Organization.
- Jorge FA, Thomazella MV, Castro Moreira D, Lopes LDG, Teixeira JVV, Bertolini DA. 2020. Evolutions and upcoming on Zika virus diagnosis through an outbreak: a systematic review. *Rev Med Virol* 30:e2105. <https://doi.org/10.1002/rmv.2105>.
- Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. 2007. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:738–739. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.02.007>.
- Barbosa CM, Di Paola N, Cunha MP, Rodrigues-Jesus MJ, Araújo DB, Silveira VB, Leal FB, Mesquita FS, Botasso VF, Zanotto PMA, Durigon EL, Silva MV, Oliveira DBL. 2018. Yellow fever virus DNA in urine and semen of convalescent patient, Brazil. *Emerg Infect Dis* 24:176–178. <https://doi.org/10.3201/eid2401.171310>.
- Reusken CBEM, Knoester M, GeurtsvanKessel C, Koopmans M, Knapen DG, Bierman WFW, Pas S. 2017. Urine as sample type for molecular diagnosis of natural yellow fever virus infections. *J Clin Microbiol* 55:3294–3296. <https://doi.org/10.1128/JCM.01113-17>.
- Chen C, Jiang D, Ni M, Li J, Chen Z, Liu J, Ye H, Wong G, Li W, Zhang Y, Wang B, Bi Y, Chen D, Zhang P, Zhao X, Kong Y, Shi W, Du P, Xiao G, Ma J, Gao GF, Cui J, Zhang F, Liu W, Bo X, Li A, Zeng H, Liu D. 2018. Phylogenomic analysis unveils evolution of yellow fever virus within hosts. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006738. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006738>.
- Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Mendez JA, Nakoune ER, Niedrig M. 2012. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol* 50:4054–4060. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12>.
- Rezende IM, Alves PA, Amuda MS, Gonçalves AP, Oliveira GFG, Pereira LS, Dutra MRT, Campi-Azevedo AC, Valim V, Tourinho R, de Oliveira JG, Calzavara CE, Said RFDC, Kroon EG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Drumond BP. 2019. Yellow fever virus genotyping tool and investigation of suspected adverse events following yellow fever vaccination. *Vaccines* 7:206–210. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040206>.
- Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, Sall AA, Niedrig M. 2013. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Viro J* 10:58. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-58>.

22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
24. Kallas EG, D'Elia Zanella LGFAB, Moreira CHV, Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, Costa PR, Dias JZC, Marmorato MP, Song ATW, Maestri A, Borges IC, Joelsons D, Cerqueira NB, Santiago e Souza NC, Morales Claro I, Sabino EC, Levi JE, Avelino-Silva VI, Ho Y-L. 2019. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 19:750–758. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30125-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30125-2).
25. MS-BR. 2020. Manual de manejo clínico da febre amarela, 1st ed Brasília.
26. Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, de Jesus JG, Gräf T, dos Santos Rodrigues CD, dos Santos CC, Sampaio SA, Chalhoub FLL, de Bruycker Nogueira F, Theze J, Romano APM, Ramos DG, de Abreu AL, Oliveira WK, do Carmo Said RF, de Albuquerque CFC, de Oliveira T, Fernandes CA, Aguiar SF, Chieppe A, Sequeira PC, Faria NR, Cunha RV, Alcantara LCJ, de Filippis AMB. 2019. Yellow fever virus reemergence and spread in south-east Brazil, 2016–2019. *J Virol* 94:e01623-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01623-19>.
27. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, Xavier J, Quirk J, Du Plessis L, Dellicour S, Théze J, Carvalho RDO, Baele G, Wu C-H, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J, Obolski U, Abade L, Vasylyeva TI, Giovanetti M, Yi D, Weiss DJ, Wint GRW, Shearer FM, Funk S, Nikolay B, Fonseca V, Adelino TER, Oliveira MAA, Silva MVF, Sacchetto L, Figueiredo PO, Rezende IM, Mello EM, Said RFC, Santos DA, Ferraz ML, Brito MG, Santana LF, Menezes MT, Brindeiro RM, Tanufi A, dos Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Rocco IM, da Costa AC, Komihalski SV, Azevedo V, Chieppe AO, Araújo ESM, Mendonça MCL, dos Santos CC, dos Santos CD, et al. 2018. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361:894–899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>.
28. Sacchetto L, Silva NIO, Rezende IM, Arruda MS, Costa TA, de Mello É, Oliveira GFG, Alves PA, de Mendonça VE, Stumpff RGA, Prado AIA, Paglia AP, Perini FA, Lacerda NM, Kroon EG, de Thois B, Trindade GS, Drumond BP. 2020. Neighbor danger: yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017–2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658>.
29. Martínez MJ, Vilella A, Pumarola T, Roldán M, Sequera VG, Vera I, Hayes EB. 2011. Persistence of yellow fever vaccine RNA in urine. *Vaccine* 29:3374–3376. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.075>.
30. Domingo C, Yadayo S, Agberu E, Demanoui M, Schulz AR, Daskalov K, Nedjig M. 2011. Detection of yellow fever 17D genome in urine. *J Clin Microbiol* 49:760–762. <https://doi.org/10.1128/JCM.01775-10>.



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

COVID-19: Neurologic Manifestations in Children

Aline Almeida Bentes^{1,2} · Walter Rebuite dos Santos Junior³ · Natalia Lima Pessoa^{3,4} · Thais Alkifeles Costa³ · Gabriela Fernanda Garcia Oliveira³ · Lilian Martins Oliveira Diniz^{1,2} · Bruna Ribeiro Torres² · Daniela Caldas Teixeira² · Renata Barandas Mendes² · Ana Beatriz Alvim Avelar² · Marco Antônio Campos⁴ · Erna Geessien Kroon³ · Betania Paiva Drumond³

Received: 17 January 2023 / Accepted: 22 February 2023 / Published online: 28 March 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

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

✉ Aline Almeida Bentes
alinebentes2000@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

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

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

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

Methods

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Immunoglobulin and/or corticosteroid

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

^aStudent's *t*-tests^bMann–Whitney *U* tests

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

Results

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

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

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

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

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

A total of 14 patients diagnosed with MIS-C were classified as neuro-COVID-19/MIS-C. The neurological symptoms or manifestations presented by 9 patients were headaches, 5 had encephalitis/encephalopathy, 2 had meningitis, 2 had peripheral neuropathy, and 1 patient presented with ataxia, diplopia, and muscle weakness (Table 1). Four of the 6 CSF samples collected from these patients showed alterations in cellularity, ranging from 8 to 175 cells/mm³, with a predominance of lymphomononuclear cells (80–100%). Two patients in this group also showed a significant increase in CSF protein (210–270 mg/dL) (Table 2).

Regarding the 7 patients with neuro-COVID-19 without MIS-C symptoms, 3 patients presented headache, 3 encephalitis/encephalopathy, 3 meningitis, 3 seizures, 2 ataxia, 1 Guillain-Barré syndrome, 1 meningitis, seizures, and cerebrovascular event, and 1 patient presented a psychiatric disorder. Six patients had neurological symptoms during the acute phase of SARS-CoV-2 infection. Two of the 6 CSF collected from these patients showed cellularity alterations (55–250 cells/mm³), and 3 had increased protein levels (117–580 mg/dL). Viral investigations in CSF performed by RT-PCR of PCR for SARS-CoV-2, DENV, ZIKV, CHIKV, herpes 1, 2, and 3 viruses, EBV, and WNV were negative (Table 2).

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

Tests (unit/d)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Reference range
Demographic / patient													
Age (y,m)	3y,2 m	1y,11 m	1 m	6y	7y	10y	2y	1y	4y	5 m	8y,3 m	3ys	-
Sex	M	M	M	M	M	M	M	F	M	M	M	F	-
Neurological symptoms	E	Gullain-Barre	E	E	Paresis behavior changes	Seizures, thrombosis	Cerebellitis	Meningitis	E	E	Meningitis	E	-
MISC symptoms	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-
Treatment	-	IGH*, gabapentin	Cefepime	Acidotic, phenytoin	Risperidone	Ceftriaxone, noradrenalin	IGH, prednisolone, aspirin	IGH, prednisolone, aspirin	IGH, prednisolone, aspirin	IGH, aspirin	IGH, prednisolone, aspirin, ceftriaxone	IGH prednisolone, aspirin, ceftriaxone	-
Days of hospitalization	2	10	12	6	9	4	12	16	6	4	14	13	-
SARS-CoV-2	-	-	-	IgG: 1234 IgM: 0.36	-	-	-	-	IgG: 3074 IgM: 0.71	IgG: 1119 IgM: 0.12	IgG: 2036 IgM: 0.28	IgG: 3245 IgM: 0.76	IgG > 50.0 IgM > 1.00
SARS-CoV-2	-	-	-	-	P	P	-	-	N	N	N	N	-
Arrigen	D	D	D	U	-	-	D	D	D	U	U	U	U
Real-time RT	U	-	U	U	U	U	-	U	-	-	U	U	U
SARS-CoV-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Real-time RT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemophilus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neisseria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pneumococcus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Other negative diagnostic tests	-	DENV, CHIKV, ZIKV, Polio, HTLV, EBV, CMV	Influenza and VRS test rapid	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	Adenovirus, metapneumovirus, parainfluenza 1-3, influenza A and B, VRS, rhinovirus	-
LCR leukocytes (cells/mm ³) (%)	1 (98 %)	3 (90 %)	1 (80 %)	55 (88 %)	1	250	12 (100 %)	175 (90 %)	1 (90 %)	32.87 %	8 (80 %)	1 (100 %)	< 5
LMN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCR glucose (mg/dL)	51	55	63	40	50	53	47	25	48	46	60	57	> 40
LCR protein (mg/dL)	< 10	117	41	152	9	580	< 10	210	14	43	277	< 10	< 40
Hemoglobin (g/dL)	13	12.4	7.1	11.9	11.7	10.2	10.1	8.3	11.2	9.3	11.0	11.4	11.5 – 13.5
Leukocytes (cells/mm ³)	8700	10,280	8900	4470	6010	7860	22,236	23,590	8430	11,110	14,600	30,530	5000–14,500
Neutrophil/lymphocyte ratio	1.72	0.8	0.98	2.88	1.34	18.8	3.45	2.7	7.2	0.65	10.6	11.25	< 5

Table 2 (continued)

Tests (units) demographic / patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Reference range
Platelets (cells/ mm ³ × 10 ³)	411	48.0	36.5	103	275	131	86	702	78	226	229	89	150–400
C-reactive protein (mg/L)	0.9	27.7	19.7	25.7	13.1	261	371	216.5	149.2	19.2	346.3	595	< 12
D-dimer (mcg/ mL)	-	0.92	-	-	-	-	5.91	3.77	51.69	1.03	4.22	5.24	≤ 0.5
Troponin (ng/mL)	-	< 1.5	-	-	-	-	49.14	< 1.5	53.4	9.86	627.2	1498	< 11
<i>IGH</i> immunoglobulin, <i>E</i> encephalitis, <i>D</i> detectable, <i>U</i> undetectable, <i>M</i> male, <i>F</i> female, <i>P</i> positive, <i>N</i> negative, -, not done													
Bold numbers or results represent alterations related to reference range													

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Declarations

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

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

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

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

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

References

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

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

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

Authors and Affiliations

Aline Almeida Bentes^{1,2}  · **Walter Rebuite dos Santos Junior³** · **Natalia Lima Pessoa^{3,4}** · **Thais Alkifeles Costa³** · **Gabriela Fernanda Garcia Oliveira³** · **Lilian Martins Oliveira Diniz^{1,2}** · **Bruna Ribeiro Torres²** · **Daniela Caldas Teixeira²** · **Renata Barandas Mendes²** · **Ana Beatriz Alvim Avelar²** · **Marco Antônio Campos⁴**  · **Erna Geessien Kroon³**  · **Betania Paiva Drumond³**

Walter Rebuite dos Santos Junior
walterrebuite@gmail.com

Natalia Lima Pessoa
natalinha_lima@hotmail.com

Thais Alkifeles Costa
alkifelescota@hotmail.com.br

Gabriela Fernanda Garcia Oliveira
gabrielafernadag@gmail.com

Lilian Martins Oliveira Diniz
lilianmodiniz@gmail.com

Bruna Ribeiro Torres
brunatorres.neuroped@gmail.com

Daniela Caldas Teixeira
caldas.dani@gmail.com

Renata Barandas Mendes
renatabarandas@gmail.com

Ana Beatriz Alvim Avelar
anab.aa@icloud.com

Marco Antônio Campos
marcoantonioscampos@gmail.com

Erna Geessien Kroon
ernagkroon@gmail.com

Betania Paiva Drumond
betaniadrmond@gmail.com

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

² Hospital Infantil João Paulo II, FHEMIG, Minas Gerais, Brazil

³ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

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

RESEARCH ARTICLE

Ecological drivers of sustained enzootic yellow fever virus transmission in Brazil, 2017–2021

Natália Ingrid Oliveira Silva^{1†}, Gregory F. Albery^{2†}, Matheus Soares Arruda¹, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira¹, Thaís Alkifeles Costa¹, Érica Munhoz de Mello^{1,3}, Gabriel Dias Moreira¹, Erik Vinícius Reis¹, Simone Agostinho da Silva³, Marlise Costa Silva³, Munique Guimarães de Almeida³, Daniel J. Becker⁴, Colin J. Carlson^{2,5}, Nikos Vasilakis^{6,7,8}, Kathryn A. Hanley⁹, Betânia Paiva Drumond^{1*}

1 Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Department of Biology, Georgetown University, Washington, DC, United States of America, **3** Laboratório de Zoonoses—Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Department of Biology, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, United States of America, **5** Center for Global Health Science and Security, Georgetown University, Washington, D.C., United States of America, **6** Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America, **7** Center for Vector-Borne and Zoonotic Diseases, The University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America, **8** Institute for Human Infection and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America, **9** Department of Biology, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico, United States of America



OPEN ACCESS

Citation: Silva NIO, Albery GF, Arruda MS, Oliveira GFG, Costa TA, de Mello EM, et al. (2023) Ecological drivers of sustained enzootic yellow fever virus transmission in Brazil, 2017–2021. *PLoS Negl Trop Dis* 17(6): e0011407. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407>

Editor: Eric H. Y. Lau, The University of Hong Kong, CHINA

Received: October 20, 2022

Accepted: May 22, 2023

Published: June 5, 2023

Copyright: © 2023 Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This study was funded by National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (<https://www.niaid.nih.gov/>) through the CREID Pilot Research Program 2021 (<https://creid-network.org/pilot-program>) awarded to BPD by the Centers for Research in Emerging Infectious

† These authors contributed equally to this work.

* Current address: Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

† These authors share first authorship on this work.

* betaniadrmond@gmail.com, betaniadrmond@utmb.edu

Abstract

Beginning December 2016, sylvatic yellow fever (YF) outbreaks spread into southeastern Brazil, and Minas Gerais state experienced two sylvatic YF waves (2017 and 2018). Following these massive YF waves, we screened 187 free-living non-human primate (NHPs) carcasses collected throughout the state between January 2019 and June 2021 for YF virus (YFV) using RTqPCR. One sample belonging to a *Callithrix*, collected in June 2020, was positive for YFV. The viral strain belonged to the same lineage associated with 2017–2018 outbreaks, showing the continued enzootic circulation of YFV in the state. Next, using data from 781 NHPs carcasses collected in 2017–18, we used generalized additive mixed models (GAMMs) to identify the spatiotemporal and host-level drivers of YFV infection and intensity (an estimation of genomic viral load in the liver of infected NHP). Our GAMMs explained 65% and 68% of variation in virus infection and intensity, respectively, and uncovered strong temporal and spatial patterns for YFV infection and intensity. NHP infection was higher in the eastern part of Minas Gerais state, where 2017–2018 outbreaks affecting humans and NHPs were concentrated. The odds of YFV infection were significantly lower in NHPs from urban areas than from urban-rural or rural areas, while infection intensity was significantly lower in NHPs from urban areas or the urban-rural interface relative to rural areas. Both YFV infection and intensity were higher during the warm/rainy season compared to the cold/dry season. The higher YFV intensity in NHPs in warm/rainy periods could be a result of higher exposure to vectors and/or higher virus titers in vectors during this time resulting in the delivery of a higher virus dose and higher viral replication levels within NHPs. Further studies are

Diseases (CREID) (<https://creid-network.org/>), grants 1U01AI15378, and 0217530. NV and KAH research is supported by CREID through "The Coordinating Research on Emerging Arboviral Threats Encompassing the Neotropics (CREATE-NEO)" of CREID (<https://creid-network.org/research-centers/create-neo/>), grant U01AI151807 by NIAID. GFA, DJB and CJC research is supported by National Science Foundation (<https://www.nsf.gov/>), grants NSF BII 2021909 and NSF BII 2213854. BPD research is also supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (CNPq) (<https://www.gov.br/cnpq/pt-br/>), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-01574-17, PROBIC) (<http://www.fapemig.br/pt/>). This study was developed with the participation of students from the Graduation Program in Microbiology of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) which is supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (<https://www.gov.br/capes/pt-br/>) (001 and 88882.348380/2010-1). The funders had no role in the design of the study, collection, analyses, or interpretation of data, writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

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

needed to better test this hypothesis and further compare the dynamics of YFV enzootic cycles between different seasons.

Author summary

In 2017 and 2018 massive sylvatic yellow fever (YF) outbreaks took place in Minas Gerais Brazil. To investigate yellow fever virus (YFV) circulation following these massive outbreaks, we investigated samples from 187 free-living non-human primate (NHPs) collected between January 2019 and June 2021. One sample belonging to a *Callithrix*, collected in June 2020 was positive for YFV. This virus was closely related to YFV from previous outbreaks (2017–2018) showing the continued enzootic circulation of YFV in the state. Next, we investigated the drivers of YFV infection and intensity (an estimation of viral load in each infected NHP) during the 2017–18 outbreaks. The odds of YFV infection in NHPs were lower in urban areas compared to rural ones as expected in sylvatic cycles. There were strong temporal and spatial patterns were observed for YFV infection and intensity, especially in the eastern part of Minas Gerais state. The higher YFV infection and intensity observed during the warm/rainy season (as opposed to the cold/dry one) could be related to higher exposure to vectors and/or higher virus titers in vectors during this time. The possible delivery of a higher virus dose in NHPs could lead to higher viral replication levels within NHPs explaining the higher intensity of infection during warm/rainy season. Further studies are needed to better test this hypothesis and further compare the dynamics of YFV enzootic cycles between different seasons.

Introduction

Mosquito-borne yellow fever virus (YFV; family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) originated in tropical and subtropical areas of Africa and was introduced to South America after European colonization [1]. YFV was almost certainly transported to the Americas via infected humans or *Aedes aegypti* mosquitoes, and while the urban cycle of yellow fever (YF) in South America continued to be maintained by *Ae. aegypti* [2–4], the virus also spilled back into non-human primates (NHPs) and arboreal, hematophagous, primatophilic mosquitoes of the genera *Haemagogus* and *Sabethes* [3]. In Brazil, the urban cycle of YF has not been documented since 1942 [3, 4]. However, sylvatic YF cycles have persisted within the Brazilian Amazon Basin [2–4] with periodic expansions towards the Central and Southern regions of the country during the warm and rainy seasons (December to May in Southeast Brazil) [3–5]. The YF surveillance program in Brazil focuses on the investigation of suspected human cases, NHP epizootics, and entomological surveillance [6], with annual reports spanning the typical transmission seasons of the disease (July to June of the following year).

In recent decades, many experts have warned that new urban outbreaks could arise from sylvatic YFV cycles in South America and deplete the limited supply of YFV vaccine [1, 7–10]. Although these fears have not yet been realized in their entirety, between 2016 and 2018 Brazil faced the largest sylvatic YF outbreak since the eradication of urban YF. The virus spread rapidly in the Southeast region of the country, reaching densely populated areas, causing thousands of cases and deaths in both NHPs and humans, and raising the specter of full-blown urban transmission mediated by *Ae. aegypti* [3, 4, 11–15]. Between 2016–2019, 2,251 YF human cases were confirmed in the Southeast region of Brazil, with 772 deaths reported [3, 4, 16]. Additionally, during this period, approximately 15,000 NHPs deaths were reported in the

country, with the confirmation of at least 1,500 cases linked to YFV [3]. Although YF waned in Minas Gerais state during 2018, YF cases were confirmed in humans or NHPs in São Paulo, Paraná and Santa Catarina states in 2019 [3, 16–18]. YF epizootics have been confirmed outside the Brazilian Amazon Basin during the YF monitoring periods of Jul 2020/Jun 2021 (Midwest: Goiás state and Federal District; Southeast: São Paulo state, and South region: Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states) [16], and Jul 2021/Jun 2022 (South: Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states, and Southeast region: Minas Gerais state) [19].

YF epizootics in NHPs often precede and overlap the occurrence of human cases [3, 20], as was observed in the recent outbreaks in Brazil [21, 22]. Although neotropical NHPs are highly susceptible to YFV infection and sentinels for viral circulation, the susceptibility of different NHP genera and species to YFV infection is still poorly characterized [3]. Some insights have been provided by investigations of NHPs during the recent epizootics in Brazil. *Callithrix* spp. (marmoset) specimens showed lower genomic viral loads (estimated by the threshold for cycle quantification value (Cq) in RTqPCR assays) compared to *Alouatta* spp. (howler monkey), *Callicebus* spp. (titi monkey) [11, 23–25], and *Sapajus* spp. (capuchin monkey) specimens [23–25]. Histopathological and immunohistochemical analyses also suggested differences among NHP genera in susceptibility to YFV infection [23, 25] and mortality rates to the virus [25]. *Alouatta* was the most affected group of NHP, with the highest proportional YF-related mortality rate. *Callicebus*, *Alouatta*, and *Sapajus* had similar genomic YFV loads, but the highest proportional mortality rate was observed in *Alouatta* infections. *Callithrix* had the lowest genomic viral loads and proportionally lowest mortality rates [25].

NHP population dynamics and susceptibility to viral infection play key roles in viral transmission and spillover [26], as do the ecological dynamics and interactions between YFV and its vectors, hosts, and abiotic factors [4, 27]. Not surprisingly, previous studies have demonstrated that NHP immunity to YFV and infection prevalence are key missing variables in predictive models, representing a significant gap in our understanding of YFV transmission that impairs our ability to forecast spillover [27]. The recent reemergence of sylvatic YF in Brazil into highly densely populated regions with low vaccination coverage in Southern Brazil clearly exposes the inadequate monitoring of YFV circulation in mosquitoes and NHPs and the underestimation of the risk of YF beyond the endemic areas. Although the seasonality of YF is well defined, little is known about the environmental, climatic, vector, and host drivers involved [28]. Some studies have already shown that some abiotic variables such as vegetation, rainfall, temperature, and human population size are important drivers in the transmission of YFV [28]. Coupled field surveillance and modeling approaches could provide crucial advances in containing, and possibly averting, future YFV outbreaks [2, 4].

Here, we investigated the occurrence of YFV in NHPs from Minas Gerais state between 2019–2021, following the outbreaks in 2017 and 2018. We used generalized additive mixed models (GAMMs) to identify the spatiotemporal drivers of YF infection and intensity in NHPs, specifically testing the hypotheses that: (i) NHP and human YFV infection prevalence would be synchronized, with peaks in NHP infections preceding those in humans, as transmission from NHP to humans is thought to occur but the reverse is not; and (ii) that YFV infections of NHP would show spatial structure across the state of Minas Gerais and among different land cover types.

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under protocol CEUA: 98/2017.

Study area and samples

The samples and data analyzed in this study were collected from Minas Gerais, the epicenter of the YF outbreak in 2017 and 2018 in Brazil, with records of 1,002 cases and 340 deaths of humans, between July 2016–June 2018 [29]. Minas Gerais borders the states of São Paulo, Rio de Janeiro, and Espírito Santo in Southeast Brazil (Fig 1A). It has a total population of 21,168,791 inhabitants, with approximately 85% living in urban areas and the remaining population living in rural areas [30]. The state is mainly covered by three biomes: Atlantic Forest, Cerrado (Brazilian Savana), and Caatinga, where different genera of NHPs can be found, including *Alouatta*, *Callithrix*, *Sapajus*, *Callicebus*, and *Brachyteles* (woolly spider monkeys) [31–33].

From January 2019 to July 2021, a total of 543 carcasses of free-living NHPs were collected in Minas Gerais by health surveillance agents as part of the YF surveillance program (mean of 30 carcasses/month). The number of NHP carcasses sampled was 3.8 times lower compared to December 2016 up to December 2018 (mean of 86 carcasses/month), when YF outbreaks were reported in the region. The NHP carcasses were frozen (-20°C) and forwarded to the Laboratory of Zoonosis of Belo Horizonte/Minas Gerais (LZOOM-MG). At LZOOM-MG, it was only possible to harvest biological specimens (liver and lungs) from 187 individuals (2019: $n = 123$; 2020: $n = 40$; 2021: $n = 24$) (S1 Table), due to the carcasses' preservation status. In 2019, only liver samples were harvested from carcasses. Starting in 2020 lung samples were also harvested from some carcasses, with the parallel purpose of investigating infection by SARS-CoV-2 [34]; lung samples were also tested for YFV whenever available. Liver and lung samples were sent to the Virus Laboratory at Universidade Federal de Minas Gerais and fragments of each tissue were preserved in the presence (at -20°C) or absence (-80°C) of RNAlater solution (Ambion/USA) until further use.

NHP carcasses were identified to the genus level by the veterinary team at LZOOM-MG using morphological criteria. Each carcass was georeferenced by the location of sampling and geographically classified by land use (urban, rural, urban-rural interface). Land use was

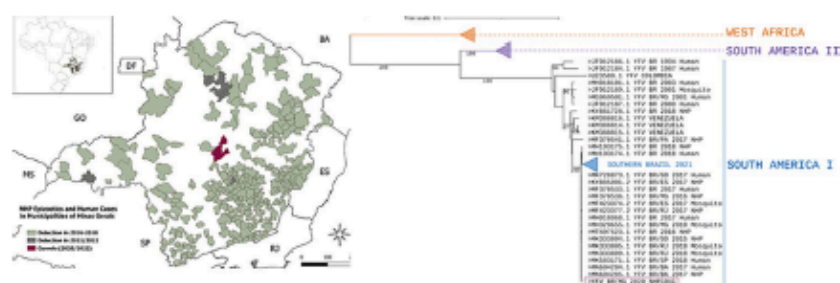


Fig 1. Circulation of yellow fever virus in Minas Gerais, 2016 to 2021. A: Map of Minas Gerais showing the location of Curvelo, where yellow fever virus was detected in a *Callithrix* sp specimen, in 2020 (purple), municipalities that had cases of yellow fever affecting human and/or non-human primate, 2016–2018 (green), and municipalities that had yellow fever epizootics confirmed from Jul 2020 to Jun 2022 (grey). The inset map displays the location of Minas Gerais in Southern Brazil. B: Phylogenetic tree reconstructed with using partial envelope sequence of yellow fever virus (1000nt). The sequence of yellow fever virus detected in a *Callithrix* sp specimen (NHP1041), in 2020, from Curvelo is shown in purple. Some branches were collapsed for clarity. The phylogenetic tree was reconstructed using the maximum likelihood method, nucleotide substitution model TN93+I, with 1000 bootstrap replicates, using PhyML. The final tree was edited and visualized using iTOL. The map was generated using shapefiles "MG_Municipios_2020.shp" and "BR_UF_2020.shp" (<https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/malas-territoriais/15774-malhas.html?=&t=acesso-ao-produto>) and QGIS, a free open source (GNU General Public License) system developed by Open Source Geospatial Foundation (https://www.qgis.org/pt_BR/site/forusers/download.html).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.g001>

classified using satellite imagery [35] as i) urban areas (built-up areas, cities, towns, villages, or isolated areas with intense human occupation and urban development); ii) urban-rural interface (transition between urban and rural areas delimited by 2.0 kilometers on the outskirts of urban areas towards the rural/sylvatic environment); and iii) rural area (sylvatic areas that covered areas located outside the urban and urban-rural transition areas) [11, 36].

Molecular screening for YFV in NHP samples

Total RNA was extracted in batches of a maximum of 15 samples at a time (liver for all NHPs and lung samples as described above), plus one negative extraction control (nuclease-free water), using the RNeasy Minikit (Qiagen, USA). To determine the suitability of the RNA, samples were submitted to a one-step real-time polymerase chain reaction (RTqPCR), using the GoTaq 1-Step RTqPCR System (Promega, USA) and primers targeting the gene coding for the endogenous control β -actin. All RNA samples were positive for the endogenous control [11, 37]. RNA samples and the negative extraction controls were screened in duplicate to investigate the presence of YFV RNA by RTqPCR (GoTaq Probe 1-Step RTqPCR System - Promega, USA), with primers and probes targeting the 5'-noncoding regions of the YFV genome [38]. Non-template, negative extraction, and positive controls (RNA from the YFV 17DD vaccine, provided by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) were used in every assay. Samples were considered positive for YFV when they presented a threshold for cycle amplification ($C_q \leq 37$ in duplicate [11]. Samples with C_q s > 37 and ≤ 40 were considered indeterminate and retested, and samples with C_q s > 40 were considered negative. When YFV RNA was detected, the sample was retested without the presence of reverse transcriptase to exclude amplicon carryover. In the case of an YFV positive sample, the clarified supernatant from the macerated sample preserved at -80°C (without RNALater solution) was used to infect C6/36 and Vero cells, followed by consecutive blind passages attempting viral isolation [37]. The supernatant of infected cells was used for RNA extraction (Qiaamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen) and tested by RTqPCR as described above. In addition, RNA from the positive sample was used as a template to generate amplicons covering part of the envelope gene of YFV using different primer combinations (YFV_500_3_left/right, YFV_500_4_left/right, YFV_500_5_left/right, and YFV_500_6_left/right) as previously described [21] using the GoTaq Probe Master Mix (Promega, USA). The amplicons were purified and sequenced with the ABI3130 platform (Applied Biosystems, USA). The consensus sequences were generated (Chromas software version 2.6.6), aligned with MAFFT (mafft.cbrc.jp/alignment/server/) and used for phylogenetic reconstruction, using the maximum likelihood method, using the nucleotide substitution model that best fitted the data (TN93 +I), with 1000 bootstrap replicates, using PhyML [39]. The final tree was edited and visualized using iTOL [40].

Generalized additive mixed models

Generalized additive mixed models (GAMMs) were used to identify the drivers of YFV infection and intensity because these models allow for non-linear trends with time, space, and abiotic drivers. All models were fitted in R version 4.1.1 [41], using the 'mgcv' package [42]. Response variables included binary qualitative liver RTqPCR results, denoting the presence or absence of infection ("infection"), and RTqPCR C_q threshold values (inversely proportional to genomic YFV load in the liver of NHPs) that represent the intensity of YFV in infected individuals ("intensity").

To conduct the analysis, we initially combined our data from 2019–2020 with previously published data from molecular YFV screening in 769 NHP carcasses from 2017 to 2018 in Minas Gerais [11, 37]. However, given the extreme low positive rate for YFV in 2019–2021

(see [Results](#)), our models only used data from 2017 and 2018 [11, 37] (S2 Table). Intensity models (i.e., RTqPCR Cq values) only included samples that were positive for YFV. RTqPCR Cqs threshold values were inverted so that larger values denoted greater intensity, with values then scaled to have a mean of 0 and a standard deviation of 1. Infection and intensity GAMMs used a binomial and Gaussian specification for the response, respectively.

GAMMs were used to investigate several key hypotheses about the drivers of YFV infection and intensity in NHPs outlined above. First, the epizootics were divided into two periods pre- and post-day 220 (corresponding to Aug 8th 2017, which was the nadir of prevalence through the cold/dry season), and an interaction between the spatial effect and the epizootics (first or second) was fitted to examine whether they differed in their geographic distributions. Finally, temporal patterns and changes in infection and intensity in our sample of NHPs were compared with total confirmed YF cases in human and NHPs in Minas Gerais state, using data from Information System for Notifiable Diseases (SINAN) the Brazilian Ministry of Health's official yellow fever surveillance program. Data regarding confirmed YF cases in human and NHPs were received from SINAN (July 8th 2021) and date of epizootic occurrence for NHPs, or date of symptom onset for humans were used.

Explanatory variables in our models included: a smoothed effect of Julian date with an adaptive smooth to examine temporal patterns; a latitude-by-longitude smoothing term to examine spatial patterns; a three-level factor to denote sample land use (urban, urban-rural interface, and rural); a three-level factor to denote carcass preservation quality (good, intermediate, and bad, as previously described [11] based on the visual inspection of carcasses taking into account the brightness, color, and consistency of the tissues, the smell, and presence or absence of parasites in the carcasses); and a three-level factor to denote the genus of NHP sampled (*Alouatta*, *Callicebus*, and *Callithrix*). We also attempted to fit the effects of local population density and gross domestic product (data from Brazilian Institute for Geography and Statistics—Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE), but neither improved the model fit or showed significant effects, and both required a substantial reduction in sample size due to missing data, so we opted not to include them in our final models.

For each effect in the GAMMs, contribution to model fit was calculated by examining their effect on the Spearman rank correlation between the models' observed and predicted values (which we call *R*). This calculation involved removing a variable from the model's predictions and calculating the correlation of the new predictions with the observed data. Removing more important variables has a greater effect on the model's fit than other, less important ones. These are then expressed as a proportion of the model's overall fit to give a representation of each variable's importance in the model. All code associated with this analysis is available at <https://github.com/viralemergence/minas-gerais-yfv>

Results and discussion

YFV enzootic circulation in NHP from Minas Gerais between 2019–2021

From January 2019 to July 2021, we screened 187 free-living NHP carcasses collected during the warm/rainy (December to May) and cool/dry periods (June to November) of 2019–2021. Both lungs and liver were screened for YFV where available; liver was available for all carcasses, and for 44 carcasses lung specimens were also available. Carcasses were collected from 70 municipalities throughout the state but mostly originated from three regions, the Metropolitan (*n* = 101, 54.0%), Zona da Mata (*n* = 21, 11.2%), and Triângulo/Alto Paranaíba (*n* = 20, 10.7%). The great majority of these carcasses (93.6%) were *Callithrix* from urban areas (Table 1).

Between 2019 and 2020, one out of 44 lung samples tested positive for YFV. This positive sample was from a *Callithrix* specimen collected during the cold/dry season in June 2020, in

Table 1. Non-human primate carcasses collected from 2019 to 2021 in Minas Gerais and screened for yellow fever virus.

Non-Human Primate		year			Total
		2019	2020	2021	
Period*	warm/rainy	50	20	12	82 (43.9%)
	cool/dry	73	20	12	105 (56.1%)
Area	Urban	94	31	24	149 (79.7%)
	Urban-rural interface	5	2	0	7 (3.7%)
	Rural	24	7	0	31 (16.6%)
Taxon	<i>Callithrix</i> spp.	114	38	23	175 (93.6%)
	<i>Alouatta</i> spp.	0	1	1	2 (1.1%)
	<i>Cebidae</i> spp.	9	1	0	10 (5.3%)
Samples**	liver	123	40	24	187
	lung	0	20	24	44

* warm/rainy period: from December to May, cool/dry period: June to November.

Samples

** Liver samples were available and analyzed for all non-human primates' carcasses. For all carcasses (n = 187) liver samples were analyzed, but in some cases (n = 44), besides liver, lung was available and also analyzed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.t001>

the central area of Minas Gerais (Fig 1A). None of 187 liver samples tested positive during this period. Three independent RNA extraction and RTqPCR experiments were performed using lung and liver samples from the YFV positive carcass with similar results. DNA template carry-over during experimental procedures was ruled out by running PCR without previous reverse transcription. Although the liver is one of the major sites for YFV replication in vertebrate hosts, it has higher RNA decay and RNA degradation rates compared to lungs [43, 44]. In addition, a high Cq (= 38.8) value was observed in RTqPCR of the positive lung sample, indicating a low genomic load in the lungs. Given the higher RNA degradation in the liver, one could expect even lower YFV RNA levels in liver and consequently lower odds of detection by RTqPCR. Attempts at viral isolation from the positive lung sample (not preserved in RNALater solution) were not successful after five blind passages in C6/36 or Vero cells, since no YFV RNA was detected in supernatant from infected cells. The low YFV genomic load observed in lung samples (as indicated by high Cq in RTqPCR) would reflect a low viral load impairing viral isolation.

A nucleotide sequence of partial envelope gene (1113 nt, Genbank accession number OP589291) of YFV confirmed the detection of wild-type YFV RNA in the lung of the *Callithrix* specimen. Phylogenetic analyses demonstrated that this YFV strain clustered within a monophyletic clade of South America genotype I, together with other YFV isolates from the recent outbreaks (2016 to 2019) in Brazil (Fig 1B).

The YFV-positive *Callithrix* specimen was collected in the rural area of the municipality of Curvelo, central Minas Gerais state, an area that was heavily affected by YF in 2017 and 2018 and from which NHP epizootics have been reported since [45, 46]. The molecular and epidemiological data point to the maintenance of YFV lineage related to 2017 and 2018 outbreaks in the enzootic cycle in Minas Gerais state up to 2020. This lineage has been proven to have undergone cryptic circulation prior to the outbreak by the end of 2016 [21, 37, 47], and to have persisted in Southern Brazil at least until 2021 [6, 37, 47–49].

Despite the significant decrease in the magnitude of NHP epizootics from the first two YF waves (2016/2017 and 2017/2018) to subsequent warm/rainy seasons, our data and data from official surveillance systems reinforce the conclusion that YFV circulates continuously in an

enzootic circulation in Minas Gerais. During the last YF surveillance period (July 2021–June 2022), eight municipalities in the state, located in areas covered by Cerrado biome (Brazilian Savana) confirmed epizootics caused by YFV [45, 46, 50]. The very low prevalence of YFV in NHPs from 2019 to 2021 observed here may reflect a real reduction in YF transmission or the use of a convenience sample provided by the YF surveillance system. After the two YF outbreaks in 2017 and 2018 during the warm/rainy season in Minas Gerais, and an intensification of the vaccination campaign, YF cases were no longer reported in humans from mid-2018 in the state [29, 51, 52]. Regarding the epizootics, a significant decrease was observed since the last outbreak in Minas Gerais in 2018, according to bulletins of the surveillance system [45]. From January 2019 to July 2021, a total of 543 carcasses of free-living NHPs were forwarded to the Laboratory of Zoonosis–Belo Horizonte/Minas Gerais by health surveillance agents as part of the YF surveillance program (mean of 30 carcasses/month). The number of NHP carcasses sampled was 3.8 times lower compared to December 2016 up to December 2018 (mean of 86 carcasses/month), when YF outbreaks were reported in the region. The decrease in the number of epizootics throughout Minas Gerais state could be related to the decline of naïve NHP populations in the state following the massive YF epizootics of 2017–2018 (due to massive death of NHP or immunity acquired by the survivors), decrease in YFV dissemination in the state [45, 46, 53] or even to eventual inadequacy on the passive surveillance system of epizootics. One of the arms of the YF surveillance system relies on the information provided by the population (especially some key social or professional groups given their activities and place of living) regarding the occurrence of sick or dead NHP in a region, followed by further epidemiological investigation [54]. COVID-19 restrictions on social activities in 2020 and 2021 could have had an impact on this information system. In addition, the majority of NHP carcasses studied here were collected in urban areas (79.7%) and were represented by *Callithrix* specimens (93.6%), likely because marmosets more tolerant of human-impacted habitats, such as rural areas, forest fragments, and forest pockets in urban areas compared to species of *Alouatta* or *Callicebus*, [55, 56] and therefore their carcasses are more likely to be spotted. Below we demonstrate that odds of YFV infection in NHPs from urban areas are significantly lower than rural-urban interface or rural areas and lower in *Callithrix* compared to *Alouatta* and *Callicebus* specimens. The shift in the distribution of submitted NHP carcasses from a more even spread across land cover types to an almost exclusive representation of urban areas may be driven by the public concern about the recent circulation of YFV in densely populated areas in southeastern states of Brazil [11–15, 29]. The predominance of carcasses of *Callithrix* sampled (in urban or rural areas) may explain the fact that the only detection of YFV RNA, from 2019–2021 was in a rural *Callithrix* specimen, despite the lower estimated odds of infection for these genera.

Drivers of YFV infection and intensity during epizootics

Although the low prevalence of YFV in NHPs observed in 2019–2021 did not allow the inclusion of this data on modeling analysis, the GAMMs explained 65% and 68% of variation in YFV infection and intensity in NHP, respectively, during 2017–2018 [11, 37]. The GAMMs allowed the fitting of a adaptive nonlinear smooths to the spatial and temporal data to identify continuous patterns across the study period, while accounting for sampling and taxonomic biases as other fixed effects. Moreover, the use of qualitative and quantitative RT-qPCR outputs as response variables, allowed us to identify whether prevalence and intensity of infection were responding similarly to ecological factors. Model coefficients and associated *p* values for infection and intensity models are listed in Table 2 with pseudo- R^2 values in Table 3 to illustrate model fit.

Table 2. Effect estimates and P values for each of the terms in our generalized additive mixed models.

Response	Variable	Estimate	Lower95	Upper95	Sig	edf	Chi_or_F	P
Infection	Intercept	2.237	0.714	8.829				0.204
	Rural area ¹	1		1				
	Urban area ¹	0.6	0.388	0.973	*			0.03
	Urban_rural_interface ¹	0.607	0.296	1.265				0.166
	Bad carcass quality ²	1		1				
	Good carcass quality ²	1.355	0.71	2.591				0.384
	Intermediate carcass quality ²	1.38	0.62	2.563				0.387
	<i>Alouatta</i> ³	1		1				
	<i>Callicebus</i> ³	0.37	0.104	1.214				0.122
	<i>Callithrix</i> ³	0.124	0.046	0.339	*			<0.001
	Date				*	6.299	39	<0.001
	Longitude					0.766	9	0.09
	Latitude				*	2.17	9	0.001
	Long/Lat				*	4.189	16	0.002
Intensity	Intercept	0.782	0.363	1.253	*			0.001
	Rural area ¹	0						
	Urban area ¹	-0.636	-0.863	-0.465	*			<0.001
	Urban_rural_interface ¹	-0.396	-0.77	-0.062	*			0.028
	Bad carcass quality ²	0						
	Good carcass quality ²	0.325	-0.043	0.702				0.079
	Intermediate carcass quality ²	0.195	-0.187	0.565				0.307
	<i>Alouatta</i> ³	0						
	<i>Callicebus</i> ³	-0.285	-0.71	0.157				0.198
	<i>Callithrix</i> ³	-0.813	-1.138	-0.489	*			<0.001
	Date				*	4.849	21	<0.001
	Longitude					0.576	9	0.15
	Latitude				*	1.784	9	0.001
	Long/Lat				*	6.015	16	<0.001

Response variables included "Infection" given by binary qualitative liver RTqPCR results, denoting the presence or absence of YFV RNA, and "Intensity" given by RTqPCR Cq threshold values representing the intensity of YFV RNA load in infected individuals. The estimates for the Infection model are given as odds ratios; the estimates for the intensity model are given as linear effects. For each linear effect, we include the GAMM slope coefficient and the 95% confidence intervals on estimates (upper 95 and lower 95). For these and all smooth terms, we include p values, effective degrees of freedom (edf), and the Chi square (for infection) or F value (for intensity). An asterisk in the column "Sig" denotes whether the variable was statistically significant ($P < 0.05$). Categorical variables are presented as [1] areas of non-human primate sampling (urban, rural or urban-rural interface), [2] the preservation status of non-human primate carcasses (good, bad, intermediate), and [3] non-human primate taxa.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.t002>

First, we tested the hypothesis that the temporal pattern of the YFV epizootic in NHPs would mirror that of human cases, with peaks in NHPs preceding those of humans. However, the temporal patterns of total epizootics (Fig 2A) and human cases (Fig 2D) (based on data from the Ministry of Health) and the YFV infection in NHP studied here were roughly equivalent (Fig 2B), and the temporal smooth was both highly significant ($P < 0.001$; Table 2) and accounted for a large proportion of the model deviance ($R = 0.54$ and $R = 0.22$; Table 3). We observed a strong temporal pattern in which YFV infection and intensity were higher during warm/rainy periods (Fig 2 and Table 2), consistent with well-known seasonal patterns of YF [5]. Broadly, both infection and mean intensity in our NHP samples were high at the start of 2017, and then dropped before increasing rapidly near the start of 2018. In NHP's, both YFV infection and intensity peaked in early 2018, approximately the same time the human cases

Table 3. R values (correlations between predicted and observed values as a proportion of the model's overall fit) for each of the fitted terms in our GAMMs.

Response	Variable	R
Infection	Area ¹	0.0116
	NHP carcass quality ²	0.0015
	Taxon ³	0.0514
	Date	0.5445
	Spatial effect	0.0398
Intensity	Area ¹	0.1863
	NHP carcass quality ²	0.0175
	Taxon ³	0.1511
	Date	0.2178
	Spatial effect	0.1037

NHP: non-human primate. Variables are presented as [1] areas of non-human primate sampling, [2] the preservation status of non-human primate carcasses, and [3] non-human primate taxa.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.t003>

peaked, and then decreased extremely rapidly (Fig 2B and 2C). The penultimate positive NHP carcass was identified on 18th March 2018, followed by a final positive carcass on April 13th 2018 (Fig 2B). As noted above, one positive sample was identified on June 18th, 2020, but excluded from GAMM analyses.

Second, we tested the hypothesis that the epizootic would be spatiotemporally structured and associated with particular land cover classes. There were strong, highly significant spatial patterns of YFV infection and intensity ($p < 0.001$; Table 2) that accounted for substantial deviance ($R = 0.04$ and $R = 0.1$; Table 3). However, patterns for infection and intensity were less correlated in space than they were with time (Fig 3) and our GAMM model fits were not improved when we allowed the spatial patterns to vary between warm/rainy periods ($\Delta DIC < 2$), implying that spatial patterns were relatively similar in these periods. Spatial patterns of epizootics during the first (2017) and second wave of YFV (2018) were similar, implying that the drivers of these epidemics did not differ notably across epidemics. Although the intensity patterns were patchier and therefore more difficult to generalize, there was a band of low prevalence stretching across the central-west part of the state, with a relatively higher infection closer to the eastern part of Minas Gerais, where most human and NHPs cases had been reported during outbreaks prior to the 2017–2018 outbreak [11, 22, 29, 45]. However, in this latest epidemic, human YFV cases were more concentrated in the northeast (2017) or in the central/southeast parts of Minas Gerais (2018), thus diverging somewhat for the foci of NHP infection [22, 29].

With respect to land cover, our GAMMs revealed that monkeys collected from the urban-rural interface had lower intensity ($p = 0.028$), but not lower odds of infection ($p = 0.17$), than those taken from rural areas (Fig 4 and Table 2); samples from fully urban areas had both lower intensity ($P < 0.001$) and probability of infection ($p = 0.03$) than those taken from rural areas. The finding of higher YFV prevalence in rural areas is consistent with the sylvatic transmission cycle of the virus and likely reflects the distribution of key YFV vectors in the genera *Haemagogus* and *Sabethes* [3, 11].

Lastly, our GAMMs demonstrated that *Callithrix* had lower odds of infection and lower intensity than samples from the genera *Alouatta* and *Callicebus* ($p < 0.01$). This pattern could be due to differential susceptibility to YFV infection [23–25], or to the higher percentage of *Callithrix* collected from urban areas, given that infection was shown to vary by land cover [3, 11].

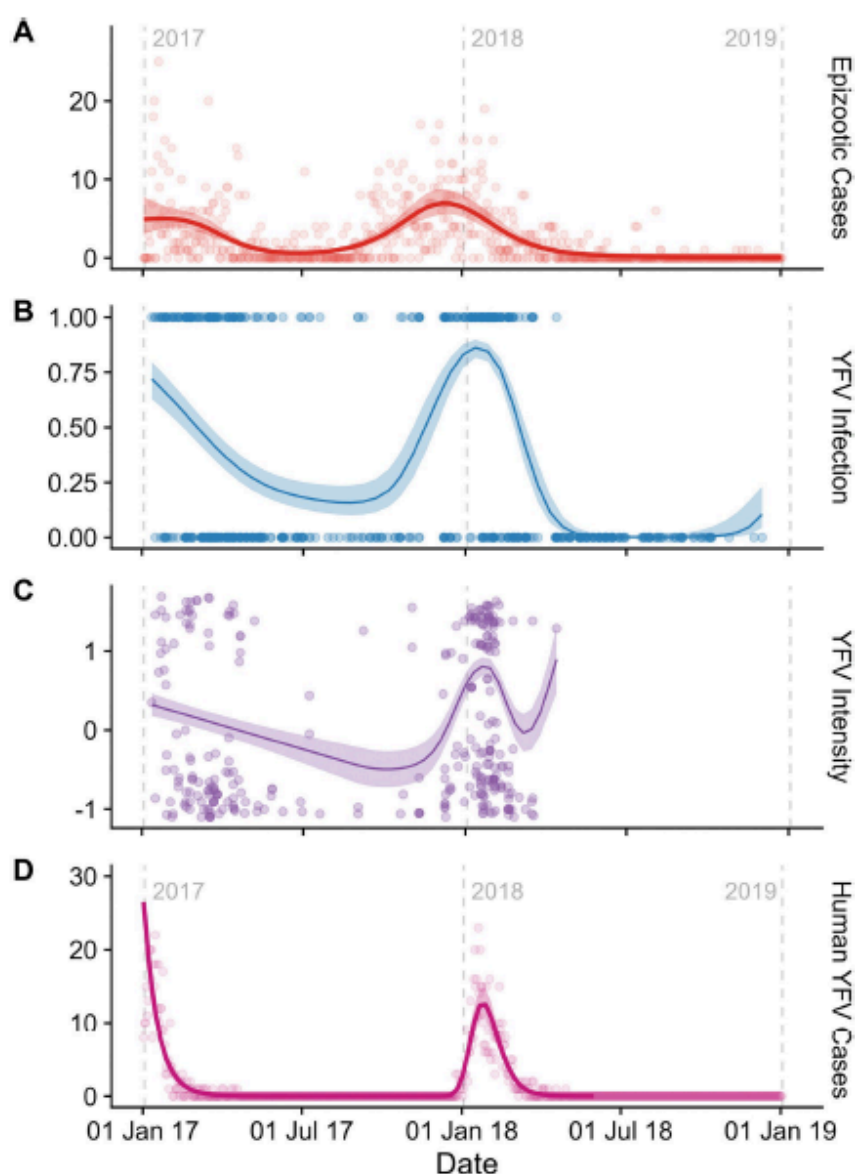


Fig 2. The temporal progression of (from top to bottom): (A) total epizootic cases, taken from the Brazilian Ministry of Health's official yellow fever surveillance program; (B) predicted YFV infection in sampled primates (points indicating positive and negative samples); (C) intensity of YFV in infected primate samples and labeled in Panel B; and (D) total of human cases taken from Brazilian Ministry of Health's official yellow fever surveillance program. Date is presented in "days after the start of 2017," with the start of each year signposted by grey dotted lines. The fitted line is the mean fit taken from our GAMMs, using an adaptive smooth; the shaded area represents the 95% confidence intervals. YFV intensity was scaled to have a mean of 0 and a standard deviation of 1. Note: the upturn to the right of the intensity curve (Panel C) is likely an artifact of the single high-intensity point that was the final collected sample, and should be disregarded.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.g002>

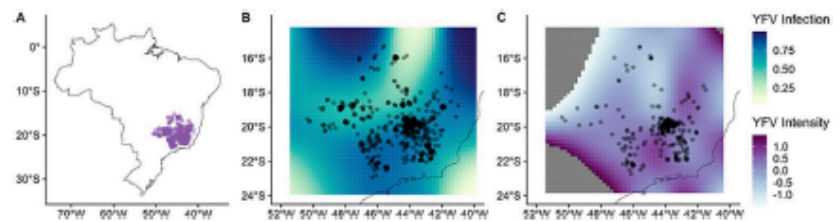


Fig 3. The geographic distribution of non-human primate carcasses. (A); predicted YFV infection (B); and predicted mean YFV intensity (C). Panels B and C were taken from our GAMMs; darker colors represent greater predicted infection and intensity. The dark black line represents the coastline of Brazil. In panels B and C peripheral areas with very low or very high predicted intensity have been removed for plotting clarity (dark grey areas), due to a tendency for extreme estimates when extrapolating outside the limits of the data. Maps were created in R using the package *rnaturalearth* (<https://www.rdocumentation.org/packages/rnaturalearth/versions/0.3.2>), and the open source/public domain Natural Earth (<https://www.naturalearthdata.com/>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.g003>

Concordance of YFV Infection Prevalence and Intensity

We found a strong, positive association between the likelihood of infection (prevalence) and infection intensity (inverse Cq value representing concentration of viral genomes) in NHPs across time and space, with peak infection and intensity occurring in the warm/rainy season in eastern Brazil. While such a relationship might be expected in an ectothermic mosquito vector,

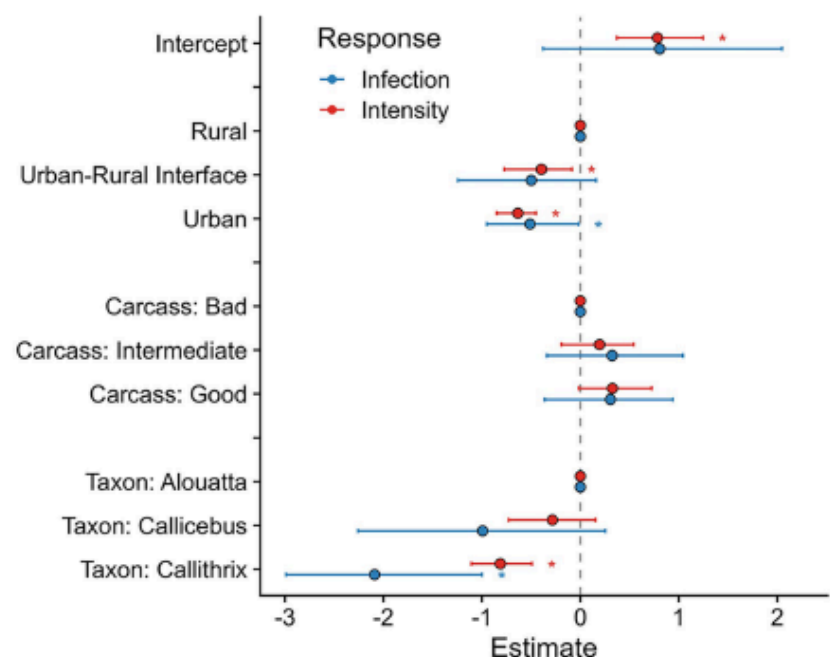


Fig 4. Fixed effect estimates taken from our GAMMs, for YFV infection (red) and intensity (blue), accounting for the nonlinear spatiotemporal variation seen in Figs 2 and 3. Dots represent the mean estimated effects; error bars are the 95% credibility intervals. Significant effects ($p < 0.05$) are marked with an asterisk (*). "Rural", "Carcass: Bad", and "Taxon: Alouatta" were all the base levels for their factor; we display them as zero to allow comparison between these factor levels and the other factor levels in the effect.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011407.g004>

where susceptibility and virus replication are both coupled to temperature (discussed below), it is not expected *a priori* in endothermic hosts. We hypothesize that this relationship may be driven by differences in the viral dose delivered to monkeys in the warm rainy season, either because NHPs receive more infectious bites during this season, or because individual mosquitoes deliver more virus per bite during this season, or both. The rationale for this hypothesis comes from the documented effects of varying virus dose in experimental arbovirus infections. Althouse and colleagues [57, 58] as well as Fox and Penna [59] have reported that experimentally increasing the dose of arbovirus delivered to an NHP or other host species leads to a higher peak viremia. Similarly, Hanley and colleagues [60] demonstrated that when mice were infected with different doses of Zika virus via different numbers of infectious mosquito bites, increasing dose resulted in higher peak viremia. Intriguingly, Hill and colleagues [61] observed that during the 2016–2018 YFV outbreaks in Brazil, the rate of YFV evolution was higher during the warm/rainy season compared to the cold/dry season, a difference that they attributed to differences in virus infection dynamics within mosquitoes but that could also stem from variation in infection dynamics in NHP hosts.

It is known that the warm/rainy season favors the reproduction of the sylvatic vectors of YFV [62, 63] which in turn would result in higher vector-biting and therefore greater potential rates of NHP exposure to YFV. Moreover, Chouin-Carneiro and colleagues [64] have shown that Zika virus infection and dissemination efficiency in Brazilian *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* is significantly greater in temperatures mimicking the Brazilian warm/wet season than temperatures mimicking the Brazilian cold/dry season. While the effects of temperature and humidity on vectorial capacity are quite complex [65], viral replication generally rises and extrinsic incubation period shrinks with increasing temperature up to some thermal limit. However, the conclusions above about the effects of temperature on virus infection, replication and dissemination are drawn from studies of *Aedes* mosquitoes, whereas the YFV outbreak under consideration here was sustained by *Haemagogus* [66] and possibly *Sabethes* mosquitoes. Unfortunately, the lack of colonized *Haemagogus* and the paucity of colonized *Sabethes* make it impossible to evaluate the impacts of temperature and humidity on the within-host dynamics of YFV replication in these genera. In lieu of such experimental studies, longitudinal surveillance of these sylvatic mosquitoes to quantify virus carriage and titer across seasons is needed.

Conclusion

Our results from surveillance data suggests the establishment and continued circulation of YFV in the enzootic cycle in Minas Gerais, despite the fade-out of human YF cases in the region. This is an important alert for public health and policy officials regarding the support of continuous surveillance efforts in this region of Brazil. Strong temporal and spatial patterns for YFV infection were observed during 2017–2018 yellow fever epizootics in Minas Gerais state, fitting the seasonal and sylvatic patterns of YF in Brazil. The higher intensity of YFV infection in NHPs during the warm/rainy season could possibly be related to higher exposure to vectors and/or higher virus titers, what could in turn affect the dynamics of YFV enzootic cycles between different seasons.

Supporting information

S1 Table. Non-human primate carcasses obtained from 2019 to 2021 and tested for the presence of yellow fever virus RNA. ID: identification of non-human primate carcasses. Area: sampling area. Urban-rural: urban-rural interface. RTqPCR-YFV: one-step real time polymerase chain reaction for investigation of yellow fever virus RNA, performed using

methods described by Domingo and colleagues, 2012 (DOI: [10.1128/JCM.01799-12](https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12)). Neg: negative result, pos: positive. * total RNA obtained from lung sample. (PDF)

S2 Table. Non-human primate carcasses used for analysis using generalized additive mixed models. ID: identification of non-human primate carcasses. Epi week: epidemiological week. Area: sampling area. Urban-rural: urban-rural interface. Lat: latitude. Long: longitude. RTqPCR-YFV: one-step real time polymerase chain reaction for investigation of yellow fever virus RNA, performed using methods described by Domingo and colleagues, 2012 (DOI: [10.1128/JCM.01799-12](https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12)). neg: negative result, pos: positive. * total RNA obtained from lung sample. Na: not available. (PDF)

Acknowledgments

We do thank the Centers for Research in Emerging Infectious Diseases (CREID), CREID Pilot Research Program, the Coordinating Research on Emerging Arboviral Threats Encompassing the Neotropics (CREATE-NEO), Laboratório de Zoonoses and Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, colleagues from Laboratório de Vírus/UFGM, and Pró-Reitorias de Graduação, de Pós-graduação e de Pesquisa/Universidade Federal de Minas Gerais/Brazil.

Author Contributions

Conceptualization: Gregory F. Albery, Colin J. Carlson, Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

Data curation: Gregory F. Albery, Betânia Paiva Drumond.

Formal analysis: Natália Ingrid Oliveira Silva, Gregory F. Albery, Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

Funding acquisition: Nikos Vasilakis, Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

Investigation: Natália Ingrid Oliveira Silva, Gregory F. Albery, Matheus Soares Arruda, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Thaís Alkifeles Costa, Érica Munhoz de Mello, Gabriel Dias Moreira, Erik Vinicius Reis.

Methodology: Gregory F. Albery, Daniel J. Becker, Colin J. Carlson, Nikos Vasilakis.

Project administration: Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

Resources: Érica Munhoz de Mello, Simone Agostinho da Silva, Marlise Costa Silva, Munique Guimarães de Almeida.

Supervision: Colin J. Carlson, Betânia Paiva Drumond.

Visualization: Gregory F. Albery, Matheus Soares Arruda, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

Writing – original draft: Natália Ingrid Oliveira Silva, Gregory F. Albery, Matheus Soares Arruda, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Thaís Alkifeles Costa, Érica Munhoz de Mello, Nikos Vasilakis, Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

Writing – review & editing: Natália Ingrid Oliveira Silva, Gregory F. Albery, Matheus Soares Arruda, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Thaís Alkifeles Costa, Érica Munhoz de Mello, Gabriel Dias Moreira, Erik Vinicius Reis, Simone Agostinho da Silva, Marlise Costa Silva,

Munique Guimarães de Almeida, Daniel J. Becker, Colin J. Carlson, Nikos Vasilakis, Kathryn A. Hanley, Betânia Paiva Drumond.

References

1. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 Years of discovery. *Jama*. 2008; 300(8):960–2. <https://doi.org/10.1001/jama.300.8.960> PMID: 18728272
2. 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> PMID: 29933925
3. Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade GDS, LaBeaud AD, de Thoisy B, et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virol J*. 2020; 23; 17(1):9. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7> PMID: 31973727
4. Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. Re-emergence of yellow fever in the neotropics—quo vadis? *Emerg Top Life Sci*. 2020; 11; 4(4):411–22. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200187> PMID: 33258924
5. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. 2015; 46(29). Available from: <http://portalsauze.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032-FA-ok.pdf>. Portuguese.
6. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Boletim Epidemiológico—Situação epidemiológica da febre amarela: monitoramento 2020/2021, agosto 2021. 2021; 52(31): 20–31. Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_31.pdf. Portuguese.
7. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med*. 2010; 30(1):237–60. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.001> PMID: 20513550
8. Chen LH, Wilson ME. Yellow fever control: Current epidemiology and vaccination strategies. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2020; 6(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s40794-020-0101-0> PMID: 31938550
9. Casey RM, Harris JB, Ahuka-Mundike S, Dixon MG, Kizito GM, Nsele PM, et al. Immunogenicity of Fractional-Dose Vaccine during a Yellow Fever Outbreak—Final Report. *N Engl J Med*. 2019; 1; 381(5):444–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710430> PMID: 29443626
10. Norton SA, Morens DM. Vaccination strategies during shortages of yellow fever vaccine. *JAMA—J Am Med Assoc*. 2018; 319(12):1280. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0200> PMID: 29584835
11. Sacchetto L, Silva NIO, de Rezende IM, Arruda MS, Costa TA, de Mello EM, et al. Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017–2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(10):1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658> PMID: 33017419
12. Hill SC, de Souza R, Théze J, Claro I, Aguiar RS, Abade L, et al. Genomic Surveillance of Yellow Fever Virus Epizootic in São Paulo, Brazil, 2016–2018. *PLOS Pathog*. 2020; 16(8):e1008699. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008699> PMID: 32764827
13. Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. *J Virol*. 2019; 94(1):1–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.01623-19> PMID: 31597773
14. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. 2017; 48(28). Available from: https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf. Portuguese.
15. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil—2017/2018. 2018; 27: 1–24. Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>. Portuguese.
16. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Boletim Epidemiológico—Situação epidemiológica da febre amarela no Monitoramento 2019/2020. 2020; 51(01): 8–19. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim-epidemiologico-vol-51-no-01>. Portuguese.
17. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Boletim Epidemiológico—Situação epidemiológica da febre amarela—Monitoramento 2020/2021, fevereiro 2021. 2021; 52(4): 6–14. Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf. Portuguese.
18. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Boletim Epidemiológico—Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 18 de 2022. 2022; 53(18): 8–14.

- Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no18>. Portuguese.
19. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022. 2022; 53 (24):5–10. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no24>. Portuguese.
 20. Klitting R, Gould EA, Paupy C, de Lamballerie X. What does the future hold for yellow fever virus? (I). *Genes*. 2018; 9(6):291. <https://doi.org/10.3390/genes9060291> PMID: 29890711
 21. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes De Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018; 361(6405):894–899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115> PMID: 30139911
 22. de Thoisy B, Silva NIO, Sacchetto L, Trindade G de S, Drummond BP. Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016–2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(10):1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008691> PMID: 33001982
 23. Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, dos Santos FCP, Nogueira JS, et al. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci Rep*. 2019; 9(1):5474. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41950-3> PMID: 30940867
 24. Mares-Guia MAMDMHorta MA, Romano A Rodrigues CDS, Mendonça MCL Dos Santos CC, et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). *Parasites and Vectors*. 2020; 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3966-x> PMID: 32075684
 25. de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, Diaz-Delgado J, Cunha MS, Saad L delC., Iglesias SD, et al. Differential Yellow Fever Susceptibility in New World Nonhuman Primates, Comparison with Humans, and Implications for Surveillance. *Emerg Infect Dis*. 2021; 27(1):47–56. <https://doi.org/10.3201/eid2701.191220> PMID: 33350931
 26. Vasconcelos PFC. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saúde Pública*. 2010; 44(6):1–6. <https://doi.org/10.1590/s0034-8910201000500046> PMID: 21109907
 27. Childs ML, Nova N, Colvin J, Mordecai EA. Mosquito and primate ecology predict human risk of yellow fever virus spillover in Brazil. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2019; 374(1782):20180335. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0335> PMID: 31401964
 28. Hamlet A, Gaythorpe KAM, Garske T, Ferguson NM. Seasonal and inter-annual drivers of yellow fever transmission in South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(1):e0008974. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008974> PMID: 33428623
 29. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Boletim epidemiológico especial -Encerramento do período sazonal Julho/2017 a Junho/2018- Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. 2018; 1–18. Available from: https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/BoletinsEpidemiologicos/Boletim_Febre_Amarela_2018_-_Consolidado_V3.pdf. Portuguese.
 30. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Panorama Populacional Minas Gerais. Portal da Transparência, Gov. Federal—Brasil. 2020. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasilmq/panorama>. Portuguese.
 31. International Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species. Vol. 2021, Version 2015. Available from: <https://www.iucnredlist.org/>.
 32. Machado FS, De Almeida ÁF, De Barros DA, Pereira JAA, Silva RA, Pereira AAS. Diversity of medium-sized and large mammals from Atlantic forest remnants in southern Minas Gerais state, Brazil. *Check List*. 2016; 12(5):1962. <https://doi.org/10.15560/12.5.1962>
 33. Drummond GM, Martins CS, Greco MB, Vieira F. Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais-Subsídio ao Programa BIOTA MINAS. 2009. Available from <https://biobiodiversitas.org.br/wp-content/uploads/2021/06/Biotaminas.pdf>.
 34. Sacchetto L, Chaves BA, Costa ER, de Menezes Medeiros AS, Gordo M, Araújo DB, et al. Lack of Evidence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spillover in Free-Living Neotropical Non-Human Primates, Brazil. *Viruses*. 2021; 25; 13(10):1933. <https://doi.org/10.3390/v13101933> PMID: 34696363
 35. Maps G. Minas Gerais state. 2022. Available from: <https://www.google.com/maps/place/Minas+Gerais/@-18.5779679,-45.4514553,6z/data=!3m1!1e4!1m5!1m3!1s0xa690a165324289:0x112170c9379de7b3!8m2!3d-17.930178!4d-43.7908453>.
 36. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Sinopse Preliminar Do Censo Demográfico. 2000; 7:1–415. Available from: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/308/cd_2000_v7.pdf. Portuguese.

37. Rezende IM de, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FC de M, Adelino TÉR, et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(6):e0006538. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006538> PMID: 29864115
38. Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(12):4054–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12> PMID: 23052311
39. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010; 59(3):307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010> PMID: 20525638
40. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(W1):W256–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239> PMID: 30931475
41. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org/>.
42. Wood SN. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol*. 2011; 73(1):3–36. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00749.x>
43. Javan GT, Finley SJ, Tuomisto S, Hall A, Benbow ME, Mills D. An interdisciplinary review of the thanatomicrobiome in human decomposition. *Forensic Sci Med Pathol*. 2019; 15(1):75–83. <https://doi.org/10.1007/s12024-018-0061-0> PMID: 30519986
44. Sampaio-Silva F, Magalhães T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ, Silvestre R. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval. *PLoS One*. 2013; (2):e56507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056507> PMID: 23437149
45. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Atualização Epidemiológica—Febre Amarela—CEVARS/DVAT/SVE/SUBVS SES/MG 15 de setembro de 2022. 2022. Available from: https://www.saude.mg.gov.br/images/2022/Boletim_Febre_Amarela_Periodo_Eleitoral_15-09-2022.pdf. Portuguese.
46. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Distribuição das epizootias ocorridas em PNH e classificação e Percentual de Cobertura Vacinal para Febre Amarela, segundo município e URS de ocorrência, Minas Gerais, Período de Monitoramento 2021–2022—NOTA INFORMATIVA No SES/SUBVS-SVE-DVAT-CEVARS 18/7/2021. 2022. Available from: https://www.saude.mg.gov.br/images/2022/Tabela_Epizootia_MG_PERIODO_MONITORAMENTO_2021-2022_15-09-2022.pdf. Portuguese.
47. Delatorre E, Abreu FVS de, Ribeiro IP, Gómez MM, dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Front Microbiol*. 2019; 10(1079). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01079> PMID: 31178835
48. Andrade M de S, Campos FS, Campos AAS, Abreu FVS, Melo FL, Sevá A da P, et al. Real-time genomic surveillance during the 2021 re-emergence of the yellow fever virus in Rio Grande do Sul state and Brazil. *Viruses*. 2021; 13(10):1976. <https://doi.org/10.3390/v13101976> PMID: 34696408
49. De Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-De-Brito A, De Castro MG, Ribeiro IP, et al. Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same Atlantic forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019; 114: e190076. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076> PMID: 31038550
50. Andrade MS, Campos FS, Oliveira CH, Oliveira RS, Campos AA, Almeida MA, et al. Fast surveillance response reveals the introduction of a new Yellow Fever Virus sub-lineage in 2021, in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022; 117: e220127. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220127> PMID: 36478156
51. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil; Boletim Epidemiológico 20. 2020; 51(20):1–47. Available from: <https://portaldeboaspraticas.iff.focruz.br/wp-content/uploads/2020/06/Boletim-epidemiologico-SVS-20-a-a.pdf>. Portuguese.
52. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Boletim epidemiológico 31. 2021. Available from: <https://portaldeboaspraticas.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf/view>. Portuguese.
53. Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais. Boletim epidemiológico. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. Período sazonal: Período sazonal: Julho/2018 a Junho/2019. 2019; 1–8. Available from: https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2019/jane_fev_mar/Febr_Amarela/Boletim_atualiza%C3%A7%C3%A3o_FA_12-02-2019.pdf. Portuguese.
54. Secretaria de Vigilância em Saúde—Ministério da Saúde Brasil. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. 2014 (1) 1–102. Available from: file:///C:/Users/betan/Downloads/guia_vigilancia_epizootias_primates_entomologia%20(4).pdf. Portuguese.

55. Bicca-Marques JC, de Freitas DS. The Role of Monkeys, Mosquitoes, and Humans in the Occurrence of a Yellow Fever Outbreak in a Fragmented Landscape in South Brazil: Protecting Howler Monkeys is a Matter of Public Health. *Trop Conserv Sci*. 2010; 3(1):78–89. <https://doi.org/10.1177/194008291000300>
56. Duarte MHL, Goulart VDLR, Young RJ. Designing laboratory marmoset housing: What can we learn from urban marmosets? *Appl Anim Behav Sci*. 2012; 137(3–4):127–36. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.11.013>
57. Althouse BM, Hanley KA. The tortoise or the hare? Impacts of within-host dynamics on transmission success of arthropod-borne viruses. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015; 370 (1675):20140299. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0299> PMID: 26150665
58. Althouse BM, Durbin AP, Hanley KA, Halstead SB, Weaver SC, Cummings DAT. Viral kinetics of primary dengue virus infection in non-human primates: A systematic review and individual pooled analysis. *Virology*. 2014; 452–453:237–46. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.015> PMID: 24606701
59. Fox JP, Penna HA. Behavior of 17D yellow fever virus in Rhesus monkeys. *Am J Epidemiol*. 1943; 38 (2):152–72. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118877>
60. Hanley KA, Azar SR, Campos RK, Vasilakis N, Rossi SL. Support for the Transmission-Clearance Trade-Off Hypothesis from a Study of Zika Virus Delivered by Mosquito Bite to Mice. *Viruses*. 2019; 11 (11):1072. <https://doi.org/10.3390/v11111072> PMID: 31752097
61. Hill SC, Dellicour S, Claro IM, Sequeira PC, Adelino T, Théze J, et al. Climate and land-use shape the spread of zoonotic yellow fever virus. Preprint MedRxiv [cited 2023 February 10]. available from <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.08.25.22278983v1.full.pdf+html>. <https://doi.org/10.1101/2022.08.25.22278983>
62. Couto-Lima D, Andreazzi CS, Leite PJ, Bersot MIL, Alencar J, Lourenço-de-Oliveira R. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic Forest, southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020; 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200218>
63. Alencar J, de Mello CF, Leite PJ, Bastos AQ, Freitas Silva SO, Serdeiro M, et al. Oviposition activity of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) during the rainy and dry seasons, in areas with yellow fever virus circulation in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2021; 16(12):e0261283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261283> PMID: 34898653
64. Chouin-Carneiro T, David MR, de Bruycker Nogueira F, dos Santos FB, Lourenço-de-Oliveira R. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(9):e0008527. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008527> PMID: 32898136
65. Bellone R, Failloux A-B. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Front Microbiol*. 2020; 11:584846. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584846> PMID: 33101259
66. Abreu FVS de, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos AAC dos, Miranda RM de, Bonelly I de S, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect*. 2019; 8(1):218–31. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180> PMID: 30866775

Communication

YELLOW ALERT: Persistent Yellow Fever Virus Circulation among Non-Human Primates in Urban Areas of Minas Gerais State, Brazil (2021–2023)

Gabriela F. Garcia-Oliveira ¹, Anna Catarina Dias Soares Guimarães ¹, Gabriel Dias Moreira ¹, Thais Alkifeles Costa ¹, Matheus Soares Arruda ¹, Érica Munhoz de Mello ², Marlise Costa Silva ³, Munique Guimarães de Almeida ³, Kathryn A. Hanley ⁴, Nikos Vasilakis ^{5,6,7}, and Betânia Paiva Drumond ^{1,*}

¹ Laboratório de Virus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte CEP 31270-901, Brazil; gabrielafernandag@gmail.com (G.F.G.-O.); annacatarinaanna@gmail.com (A.C.D.S.G.); gabriel.dias05082000@gmail.com (G.D.M.); alkifelesthai@gmail.com (T.A.C.); matheusmtsa095@gmail.com (M.S.A.)

² Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte CEP 31270-705, Minas Gerais, Brazil

³ Laboratório de Zoonoses, Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte CEP 31270-705, Minas Gerais, Brazil

⁴ Department of Biology, New Mexico State University, Las Cruces, NM 88003-8801, USA; khanley@nmsu.edu

⁵ Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-0609, USA; nivasila@utmb.edu

⁶ Center for Vector-Borne and Zoonotic Diseases, The University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-0609, USA

⁷ Institute for Human Infection and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-0610, USA

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



Citation: Garcia-Oliveira, G.F.; Guimarães, A.C.D.S.; Moreira, G.D.; Costa, T.A.; Arruda, M.S.; de Mello, É.M.; Silva, M.C.; de Almeida, M.G.; Hanley, K.A.; Vasilakis, N.; et al. YELLOW ALERT: Persistent Yellow Fever Virus Circulation among Non-Human Primates in Urban Areas of Minas Gerais State, Brazil (2021–2023). *Viruses* **2024**, *16*, 31. <https://doi.org/10.3390/v16010031>

Academic Editor: Sonja Marie Best

Received: 30 November 2023

Revised: 15 December 2023

Accepted: 19 December 2023

Published: 23 December 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Yellow fever virus (YFV) is the agent of yellow fever (YF), which affects both humans and non-human primates (NHP). Neotropical NHP are highly susceptible to YFV and considered sentinels for YFV circulation. Brazil faced a significant YF outbreak in 2017–2018, with over 2000 human cases and 2000 epizootics cases, mainly in the State of Minas Gerais, Brazil. This study aimed to investigate whether YFV circulation persisted in NHP after the human outbreak had subsided. To this end, NHP carcass samples collected in Minas Gerais from 2021 to 2023 were screened for YFV. RNA was extracted from tissue fragments and used in RT-qPCR targeting the YFV 5'UTR. Liver and lung samples from 166 animals were tested, and the detection of the β -actin mRNA was used to ensure adequacy of RNA isolation. YFV RNA was detected in the liver of 18 NHP carcasses collected mainly from urban areas in 2021 and 2022. YFV positive NHP were mostly represented by *Callithrix*, from 5 out of the 12 grouped municipalities (mesoregions) in Minas Gerais state. These findings reveal the continued YFV circulation in NHP in urban areas of Minas Gerais during 2021 and 2022, with the attendant risk of re-establishing the urban YFV cycle.

Keywords: Brazil; yellow fever; yellow fever virus; epizootics; outbreaks; non-human primate; surveillance; *Orthoflavivirus*

1. Introduction

Mosquito-borne yellow fever virus (YFV) (*Orthoflavivirus flavi*) (family *Flaviviridae*, genus *Orthoflavivirus*) is the etiologic agent of yellow fever (YF), an acute viral hemorrhagic and viscerotropic disease in both human and non-human primates (NHPs). YFV is currently endemic in tropical regions of Africa and South America. There are three known transmission cycles of YFV; in the sylvatic (jungle) cycle, NHPs serve as the primary reservoirs and amplification hosts, while humans are incidental hosts and mosquitoes of the genera *Aedes* (in Africa), *Sabethes*, and *Haemagogus* (in the Americas) serve as vectors. In the

urban transmission cycle, humans are the primary hosts and the anthropophilic mosquito *Aedes aegypti* is the vector. Finally, the rural transmission cycle has been initially described in Africa and occurs at the interface between urban and rural or forested land covers. *Aedes* mosquitoes are implicated in the rural cycle, giving rise to isolated rural epidemics, which have the potential to trigger broader urban outbreaks [1–5].

Between the end of the urban YFV cycle in Brazil in 1942 up to 2000, the YFV sylvatic cycle was largely confined to the Amazon basin (Figure 1), although the virus sporadically re-emerged outside this region, especially during rainy periods accompanied by elevated temperatures [5,6]. Several factors underpin the reemergence of YFV in Southern Brazil, including inadequate vaccination coverage; the abundance of sylvatic vectors and NHP hosts; favorable climatic conditions; the emergence of new virus lineages; and the movement of infected humans and NHPs into new areas sharing these conducive conditions [6]. In addition, during the recent YF outbreaks in Brazil, the observed temporal and geographical patterns of YFV dispersion indicated the important role of vectors in YFV movement [7,8]. From late 2016 to 2018, Brazil experienced a dramatic shift in YF epidemiology, with a major outbreak in the Southeast region of the country. The state of Minas Gerais (MG) (Figure 1) was recognized as the epicenter of the epidemic. From July 2016 to June 2018, the outbreak resulted in more than 2000 human cases, with 760 deaths in the country. More than 2000 confirmed infections in NHP were documented during this time, including NHP carcasses sampled in urban areas, and current evidence suggests that all human cases were related to the sylvatic cycle [5,9–13].

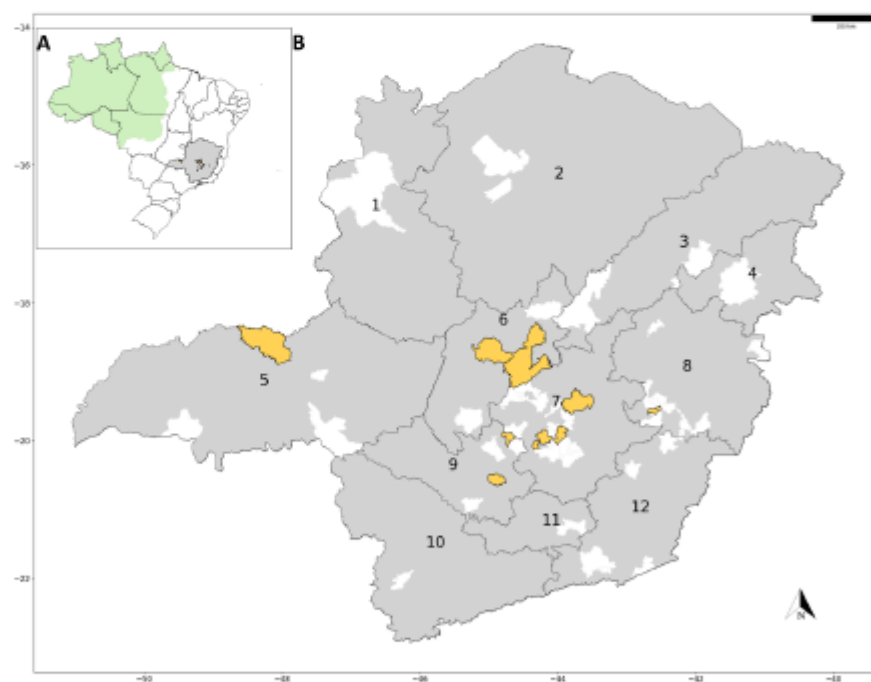


Figure 1. Detection of yellow fever virus RNA in carcasses of non-human primates in Minas Gerais state, Brazil, 2021–2022. (A) Map of Brazil outlines the states (black lines) and highlights the Amazon basin (in green) and Minas Gerais state (in grey). (B) In detail, the map of Minas Gerais state displays mesoregion boundaries (black lines), municipalities where YFV RNA was detected in NHP in this study (yellow), and municipalities where YFV was not detected in NHP in this study (white). The 12 mesoregions of Minas Gerais state are shown as follows: 1: Northwest; 2: North; 3: Jequitinhonha; 4: Mucuri Valley; 5: Triângulo Mineiro; 6: Central; 7: Metropolitan; 8: Rio Doce Valley; 9: Western; 10: South/Southwest; 11: Southeast; 12: South.

11: Campo das Vertentes; 12: Zona da Mata. The map was generated using the geobr package, IBGE shapefile for Brazilian hydrographic basins (https://www.ibge.gov.br/geociencias/downloads-geociencias.html?caminho=informacoes_ambientais/estudos_ambientais/bacias_e_divisoes_hidrograficas_do_brasil/2021/Divisao_Hidrografica_Nacional_DHN250/vetores/ accessed on 13 October 2023), and Python 3.11.5.

After the outbreak and extending into the current monitoring period (from July 2023 to June 2024), vectors, NHPs, and human cases of YFV infection have been continuously reported outside the Amazon Basin in Brazil [14–21]. These reports underscore the ongoing circulation of YFV in Southern Brazil. Thus, we undertook an investigation of YFV infection within NHP carcasses collected from February of 2021 to August of 2023 from different covers, including urban settings, in MG.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area and Samples

MG state is located in Southeast Brazil, bordering the states of São Paulo, Rio de Janeiro, and Espírito Santo (Southeast Brazil), Bahia (Northeast Brazil), and Mato Grosso do Sul and Goiás (Midwest Brazil) (Figure 1A). It has a total population of approximately 20.5 million inhabitants concentrated (85%) in urban areas that correspond to 0.8% of its total territory (586,513,983 km²) [22]. MG state is subdivided into 12 mesoregions based on the economic and social traits of the municipalities (Figure 1B). The state is covered by three main biomes: Atlantic Forest, Cerrado (Brazilian savannah), and Caatinga. Different genera of NHPs have been described in the state as *Alouatta*, *Callithrix*, *Sapajus*, *Callicebus*, and *Brachyteles* [23,24].

The molecular investigation of YFV was carried out using liver and lung samples obtained from 166 carcasses of free-living NHPs collected in 54 municipalities across MG state from February 2021 to August 2023 (Table 1). The carcasses were collected by health surveillance agents as part of the YF surveillance program and forwarded to the Laboratory of Zoonosis of Belo Horizonte, MG, where all carcasses were tested as negative for rabies. The collection of NHP carcasses spanned both the rainy (October to March) and dry (April to September) seasons. This collection encompassed urban, urban–rural transition, and rural/forested areas in 11 mesoregions within MG state (Figure 1B, Table 1). Information was obtained from epidemiological records regarding the address or geographic coordinates where carcasses were collected and used to classify the carcasses based on land use as urban (built-up) areas, peri-urban areas, and rural/forested areas, as previously described [11]. Among the 166 carcasses studied, a majority (89.2%) were identified as *Callithrix* genus, while a smaller portion belonged to *Alouatta* genus (2.4%) or the Cebidae family (3.6%), while some carcasses (4.8%, $n = 8$) could not be definitively identified (Table 1).

Table 1. Non-human primate carcasses sampled and tested for yellow fever virus, Minas Gerais state, 2021–2023.

NHP		Year						Total	
		2021		2022		2023			
		Total	+	Total	+	Total	+	Total	+
Season	Rainy	13	6	18	1	11	0	42	7
	Dry	41	4	46	5	19	0	106	9
	NA *	3	0	5	2	10	0	18	2
Sample collection area	Urban	40	8	44	5	0	0	84	13
	Peri-urban	4	0	6	0	0	0	10	0
	Rural/forested	9	2	10	1	0	0	19	3
	NA *	4	0	9	2	40	0	53	2

Table 1. Cont.

NHP	Taxon	Year						Total	
		2021		2022		2023		Total	
		Total	+	Total	+	Total	+	Total	+
	<i>Callithrix</i> spp.	52	10	59	6	37	0	148	16
	<i>Alouatta</i> spp.	1	0	2	0	1	0	4	0
	Cebidae	1	0	3	0	2	0	6	0
	NA *	3	0	5	2	0	0	8	2
State Mesoregion	Central	7	1	8	1	0	0	15	2
	Triangulo Mineiro	3	1	4	0	2	0	9	1
	Rio Doce Valley	3	1	10	0	8	0	21	1
	Campo das Vertentes	0	0	0	0	1	0	1	0
	Jequitinhonha	0	0	1	0	2	0	3	0
	Metropolitan	32	5	30	5	24	0	86	10
	North	1	0	3	0	0	0	4	0
	Northwest	1	0	1	0	0	0	2	0
	South/Southwest	0	0	1	0	1	0	2	0
	West	4	2	3	0	1	0	8	2
	Zona Da Mata	3	0	3	0	1	0	7	0
	NA *	3	0	5	2	0	0	80	2
Total		57	10	69	8	40	0	166	18

NA *: not available, missing information in the epidemiological investigation files. NHP: non-human primate, +: positive.

2.2. YFV Screening

Fragments of 20 to 30 mg of tissues (lung and liver), previously obtained from the NHP carcasses and preserved in RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen—Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at -80°C , were separately used for total RNA extraction (RNeasy® Mini Kit total RNA extraction kit—QIAGEN, Venlo, Holanda). The fragments were placed in screw-cap tubes containing 600 μL of the lysis solution, provided by the kit, and three 2 mm borosilicate beads (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). They were then agitated for two minutes using a bead beater (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) to ensure homogeneity for the next steps. RNA extraction was performed in batches of up to 13 samples plus a negative extraction control (nuclease-free water).

One-step RT-qPCR (GoTaq® Probe 1-step RT-qPCR System kit, Promega Corporation, Madison, WI, USA) for endogenous control β -actin coding gene (Table S1) [25] was performed to confirm the viability of total RNA extracted. All samples were positive, showing suitability to be used as templates for RT-qPCR. Each RNA sample, along with the negative extraction controls (2.5 μL), were screened in duplicate for YFV RNA by RT-qPCR (GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System kit, Promega Corporation, Madison, WI, USA) with primers and probe (Table S1) targeting the 5' untranslated region of YFV viral genome [26]. In addition, a non-template control (nuclease-free water) and a positive control (YFV 17DD RNA, kindly provided by Dr. Pedro Augusto Alves from FIOCRUZ Minas Gerais) were used in each set of RT-qPCR. Samples that presented a cycle threshold for amplification (Cq) ≤ 37 in duplicate or >40 were confidently considered positive and negative for YFV, respectively. Samples with Cq values > 37 and ≤ 40 were initially categorized as indeterminate and subjected to retesting. They were only classified as positive if they yielded consistent positive results in duplicate with Cq values ≤ 40 during the second round of testing.

To ensure accuracy, all samples that initially tested positive for YFV RNA underwent further testing. This involved employing the same primers and probes for YFV in two distinct conditions: RT-qPCR (with reverse transcriptase) and PCR (without reverse transcriptase). This comprehensive approach was implemented to eliminate the possibility of amplicon carryover. In addition, aiming to genotype [25] YFV, RNA from the positive

samples were used as templates in RT-qPCR using a pan-orthoflavivirus protocol targeting the NS5 genome region [27] (Table S1).

3. Results and Discussion

Liver and lung samples from 166 NHP carcasses collected over a span of three years (February 2021 to August 2023) were tested for the presence of YFV RNA. Liver samples from 18 NHP carcasses were positive (Table S2) while all lung samples were negative. Positive samples showed Cqs ranging from 33.4 to 37.3 with an average Cq of 36.1. The 18 positive samples only showed amplicons when used in RT-qPCR, with no amplicons being detected in PCR reactions (in absence of reverse transcriptase). Positive RNA samples were obtained from five different RNA extraction batches, each one with a negative extraction control. All non-template controls and negative RNA extraction controls showed negative results for RT-qPCR. Unfortunately, none of the positive samples yielded amplicons suitable for further genotyping. The inability to generate NS5 fragment amplicons for genotyping may be related to either RNA degradation or the low viral load of the samples indicated by the high Cq values.

The greater detection of YFV in NHP carcasses collected during the dry season may be attributable to a sampling bias. This bias stems from the fact that the carcasses were collected as part of the passive surveillance of YF. In addition, the lower humidity and cooler temperatures observed during the dry season could contribute to reduced carcass decomposition rates and, subsequently, an increased likelihood of sampling [28]. The majority of the 18 positive NHPs were *Callithrix penicillata* (89%), which were mostly obtained in urban areas (72%) (Table 1). The low YFV genomic loads observed in *Callithrix*, indicated by high Cq values in RTqPCR, were also previously described in other studies during periods of intense YFV circulation during the outbreaks [11–13], or during periods with low viral circulation after the outbreaks [18,20]. The lower viral loads observed in *Callithrix* compared to specimens of other genera could be related to their susceptibility to YFV and their role in YFV maintenance and transmission cycles should be further investigated [11–13]. The greater detection of YFV in *Callithrix* specimens may reflect the remarkable behavioral plasticity of this genus, enabling them to thrive in densely populated areas and urban environments [29], where some other species cannot persist. In fact, in a previous study, the majority of NHP carcasses (436 out of 781) sampled during the epizootics of YF in 2017/2018 in MG, corresponded to *Callithrix* specimens, with an infection rate for YFV of 27% in several urban areas of MG [13]. Although we only detected YFV in NHP carcasses collected in 2021 ($n = 10$) and in 2022 ($n = 8$), data from the Health Department of MG confirmed a case of YF in a human being in 2023 [30]. The YFV-positive NHP carcasses originated from 6 out of 12 mesoregions of MG (Figure 1B, Table 1). Although vaccination coverage has increased within the human population since the last outbreaks, a concerning observation is that some of the mesoregions of Minas Gerais with YFV circulation have municipalities with YF vaccination coverage below the recommended threshold of 95% [17,31,32].

The regions where YFV was detected here were heavily affected during the YF outbreaks in 2017/2018, with subsequent records of YF in NHPs [31,32]. The enduring presence of YFV could be linked to the ongoing circulation of the virus associated with previous outbreaks [18] or to a new introduction of YFV in the region, as recently described in 2021 [20]. Silva and colleagues [18] have demonstrated the maintenance of the YFV lineage related to 2017/2018 outbreaks in the enzootic cycle in MG state up to 2020. Previous studies lend further support to the continued enzootic circulation of YFV within MG since the 2017/2018 outbreaks, in NHPs [18,20,31,32] and vectors [21] during rainy or dry seasons, and in rural/forested or urban areas, reinforcing the fact that YFV has suitable ecological conditions for its maintenance in the state [33]. These facts raise concerns related to the establishment of YFV enzootic cycles, including urban areas in Southeast Brazil, currently considered a non-endemic region for YF, with risks of viral spillover to the human population. Notably, during 2023, human cases confirmed by laboratory criteria, often involving

individuals with a history of exposure to wild areas, have been reported in Minas Gerais, São Paulo (Southeast region), Paraná, and Rio Grande do Sul states (South region) [16,30].

There is an urgent need for further research focusing on YFV vectors, hosts, and their interactions in urban settings in Southern Brazil. Such studies are essential for gaining a deeper understanding of the dynamics of the YFV sylvatic cycle, particularly in non-endemic areas like MG and especially within urban environments. Our findings emphasize the critical importance of sustained surveillance and further studies of YFV circulation in urban areas in Southern Brazil to safeguard public health.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v16010031/s1>; Table S1: Primers and probe for RT-qPCR. Table S2: Non-human primate carcasses obtained from 2021 to 2023, Minas Gerais, Brazil, and tested for the presence of yellow fever virus RNA.

Author Contributions: Conceptualization, B.P.D.; Methodology, B.P.D.; Formal Analysis, G.F.G.-O., A.C.D.S.G. and B.P.D.; Investigation, G.F.G.-O., A.C.D.S.G., G.D.M., T.A.C. and M.S.A.; Resources, E.M.d.M., M.C.S. and M.G.d.A.; Writing—Original Draft Preparation, G.F.G.-O. and B.P.D.; Writing—Review and Editing, G.F.G.-O., A.C.D.S.G., G.D.M., T.A.C., M.S.A., E.M.d.M., M.C.S., M.G.d.A., K.A.H., N.V. and B.P.D.; Visualization, G.F.G.-O. and B.P.D.; Supervision, K.A.H., N.V. and B.P.D.; Project Administration, K.A.H., N.V. and B.P.D.; Funding Acquisition, K.A.H., N.V. and B.P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) through the Centers for Research in Emerging Infectious Diseases (CREID) “The Coordinating Research on Emerging Arboviral Threats Encompassing the Neotropics (CREATE-NEO)” grant U01 AI151807 (to NV/KAH). BPD research is also supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (CNPq) (<https://www.gov.br/cnpq/pt-br>, accessed on 13 October 2023). GFGO, TAC, and MSA are students from the Graduation Program in Microbiology of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), which is supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES) (<https://www.gov.br/capes/pt-br> accessed on 13 October 2023) (001, and 88882.348380/2010-1). ACDSG and GDM were supported by FAPEMIG undergraduate scholarship grants.

Institutional Review Board Statement: Ethical approval for the study was granted by the Committee on Ethics in the Use of Animals at the Universidade Federal de Minas Gerais under protocol: CEUA: 98/2017, approved on 26 September 2022.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All research data is shared within the manuscript and Supplementary Tables S1 and S2.

Acknowledgments: We would like to thank the Laboratório de Zoonoses and the Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, colleagues from Laboratório de Vírus/UFMG, Pró-Reitorias de Graduação, Pós-graduação, and Pesquisa from Universidade Federal de Minas Gerais/Brazil.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, collection, analyses, or interpretation of data, writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Monath, T.P.; Vasconcelos, P.E.C. Yellow Fever. *J. Clin. Virol.* **2015**, *64*, 160–173. [CrossRef] [PubMed]
2. Douam, E.; Ploss, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 913–928. [CrossRef] [PubMed]
3. World Health Organization (WHO). *A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017–2026*; WHO: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 9789241513661. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241513661> (accessed on 4 September 2023).
4. Sacchetto, L.; Drumond, B.P.; Han, B.A.; Nogueira, M.L.; Vasilakis, N. Re-Emergence of Yellow Fever in the Neotropics—Quo Vadis? *Emerg. Top. Life Sci.* **2020**, *4*, 411–422. [CrossRef]

5. Silva, N.I.O.; Sacchetto, L.; De Rezende, I.M.; Trindade, G.D.S.; Labeaud, A.D.; De 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] [PubMed]
6. Vasconcelos, P. Yellow Fever in Brazil: Thoughts and Hypotheses on the Emergence in Previously Free Areas. *Rev. Saude Publica* **2010**, *44*, 1144–1149. [CrossRef] [PubMed]
7. Lacerda, A.B.; del Castillo Saad, L.; Ikefuti, P.V.; Pinter, A.; Chiaravalloti-Neto, F. Diffusion of Sylvatic Yellow Fever in the State of São Paulo, Brazil. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16277. [CrossRef] [PubMed]
8. Ribeiro, I.P.; Delatorre, E.; de Abreu, F.V.S.; Dos Santos, A.A.C.; Furtado, N.D.; Ferreira-de-Brito, A.; de Pina-Costa, A.; Neves, M.S.A.S.; de Castro, M.G.; Motta, M.A.; et al. Ecological, Genetic, and Phylogenetic Aspects of YFV 2017–2019 Spread in Rio de Janeiro State. *Viruses* **2023**, *15*, 437. [CrossRef] [PubMed]
9. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Especial Febre Amarela no Brasil N01/2017. Available online: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3408806/mod_resource/content/1/Informe%20Especial%20sobre%20FA%202017.pdf (accessed on 4 September 2023).
10. Ministério da Saúde. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela—Informe 26. 2018. Available online: <https://sbim.org.br/images/files/informe-fa-21-11abr18-c.pdf> (accessed on 4 September 2023).
11. Sacchetto, L.; Silva, N.I.O.; de Rezende, I.M.; Arruda, M.S.; Costa, T.A.; de Mello, E.M.; Oliveira, G.F.G.; Alves, P.A.; de Mendonça, V.E.; Stumpp, R.G.A.V.; et al. Neighbor Danger: Yellow Fever Virus Epizootics in Urban and Urban-Rural Transition Areas of Minas Gerais State, during 2017–2018 Yellow Fever Outbreaks in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008658. [CrossRef] [PubMed]
12. Mares-Guia, M.A.M.D.M.; Horta, M.A.; Romano, A.; Rodrigues, C.D.S.S.; Mendonça, M.C.L.L.; dos Santos, C.C.; Torres, M.C.; Araujo, E.S.M.M.; Fabri, A.; De Souza, E.R.; et al. Yellow Fever Epizootics in Non-Human Primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 90. [CrossRef] [PubMed]
13. de Azevedo Fernandes, N.C.C.; Guerra, J.M.; Díaz-Delgado, J.; Cunha, M.S.; delC Saad, L.; Iglesias, S.D.; Ressio, R.A.; dos Santos Cirqueira, C.; Kanamura, C.T.; Jesus, I.P.; et al. Differential Yellow Fever Susceptibility in New World Nonhuman Primates, Comparison with Humans, and Implications for Surveillance. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 47–56. [CrossRef] [PubMed]
14. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico 01, v54. Monitoramento dos Casos de Arboviroses Até a Semana Epidemiológica 52 de 2022. Available online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/view> (accessed on 4 September 2023).
15. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico 04, v54. Estrutura e Atividades das Unidades de Vigilância de Zoonoses no Brasil. 2022. Available online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-04/view> (accessed on 4 September 2023).
16. Pan American Health Organization/World Health Organization. Atualização Epidemiológica de Febre Amarela Na Região Das Américas. 2023, pp. 1–7. Available online: <https://www.paho.org/pt/documentos/atualizacao-epidemiologica-febre-amarela-na-regiao-das-americas-25-abril-2023> (accessed on 4 September 2023).
17. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Nota Informativa SES/SUBVS-SVE-DVAT-CEPI 4618/2023. Available online: https://www.saude.mg.gov.br/images/1_noticias/06_2023/1-out-nov-dez/SEL_74582666_SES_Nota_Informativa_4618.pdf (accessed on 29 November 2023).
18. Silva, N.I.O.; Albery, G.E.; Arruda, M.S.; Oliveira, G.F.G.; Costa, T.A.; de Mello, E.M.; Moreira, G.D.; Reis, E.V.; da Silva, S.A.; Silva, M.C.; et al. Ecological Drivers of Sustained Enzootic Yellow Fever Virus Transmission in Brazil, 2017–2021. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2023**, *17*, e0011407. [CrossRef] [PubMed]
19. Andrade, M.D.S.; Campos, E.S.; Campos, A.A.S.; Abreu, F.V.S.; Melo, F.L.; Sevá, A.D.P.; Cardoso, J.D.C.; Dos Santos, E.; Born, L.C.; Silva, C.M.D.; et al. Real-Time Genomic Surveillance during the 2021 Re-Emergence of the Yellow Fever Virus in Rio Grande Do Sul State, Brazil. *Viruses* **2021**, *13*, 1976. [CrossRef]
20. Andrade, M.S.; Campos, E.S.; de Oliveira, C.H.; Oliveira, R.S.; Campos, A.A.S.; de Almeida, M.A.B.; Fonseca, V.d.S.; Simonini-Teixeira, D.; Sevá, A.d.P.; Temponi, A.O.D.; et al. Fast Surveillance Response Reveals the Introduction of a New Yellow Fever Virus Sub-Lineage in 2021, in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2022**, *117*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
21. de Oliveira, C.H.; Andrade, M.S.; Campos, E.S.; da C Cardoso, J.; Gonçalves-dos-Santos, M.E.; Oliveira, R.S.; Aquino-Teixeira, S.M.; Campos, A.A.; Almeida, M.A.; Simonini-Teixeira, D.; et al. Yellow Fever Virus Maintained by Sabethes Mosquitoes during the Dry Season in Cerrado, a Semiarid Region of Brazil, in 2021. *Viruses* **2023**, *15*, 757. [CrossRef] [PubMed]
22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama Minas Gerais. Available online: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/panorama> (accessed on 29 November 2023).
23. International Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species. Available online: <https://www.iucnredlist.org/> (accessed on 4 October 2023).
24. Drummond, G.M.; Martins, C.S.; Greco, M.B.; Vieira, F. Diagnóstico Do Conhecimento Sobre a Biodiversidade No Estado de Minas Gerais-Subsídio Ao Programa BIOTA MINAS. 2009. Available online: <https://biodiversitas.org.br/wp-content/uploads/2021/06/Biotaminas.pdf> (accessed on 4 September 2023).
25. Rezende, I.M.; Alves, P.A.; Arruda, M.S.; Gonçalves, A.P.; Oliveira, G.F.G.; Pereira, L.S.; Dutra, M.R.T.; Campi-Azevedo, A.C.; Valim, V.; Tourinho, R.; et al. Yellow Fever Virus Genotyping Tool and Investigation of Suspected Adverse Events Following Yellow Fever Vaccination. *Vaccines* **2019**, *7*, 206. [CrossRef] [PubMed]

26. Domingo, C.; Patel, P.; Yillah, J.; Weidmann, M.; Méndez, J.A.; Nakouné, E.R.; Niedrig, M. Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 4054–4060. [CrossRef] [PubMed]
27. Patel, P.; Landt, O.; Kaiser, M.; Faye, O.; Koppe, T.; Lass, U.; Sall, A.A.; Niedrig, M. Development of One-Step Quantitative Reverse Transcription PCR for the Rapid Detection of Flaviviruses. *Virology* **2013**, *45*, 58. [CrossRef] [PubMed]
28. Archer, M.S. Rainfall and Temperature Effects on the Decomposition Rate of Exposed Neonatal Remains. *Sci. Justice J. Forensic Sci. Soc.* **2004**, *44*, 35–41. [CrossRef]
29. Vilela, A.A.; Del-Claro, K. Feeding Behavior of the Black-Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) (Primate, Callitrichidae) in a Tropical Cerrado Savanna. *Sociobiology* **2011**, *58*, 309–314.
30. Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde Nota Técnica—Óbito Humano Febre Amarela. 2023. Available online: http://www.huav.com.br/estudos/Alerta_FA.pdf (accessed on 4 October 2023).
31. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Distribuição Das Epizootias Ocorridas Em PNH e Classificação e Percentual de Cobertura Vacinal 1 Para Febre Amarela, Segundo Município e URS de Ocorrência, Minas Gerais, Período de Monitoramento 2 2021–2022. Available online: https://www.saude.mg.gov.br/images/2023/Arquivos%20FA/31_07/Distribui%C3%A7%C3%A3o%20das%20epizootias%20ocorridas%20em%20PNH%202021-2022%20em%20MG%20-%2031.07.2023.pdf (accessed on 4 October 2023).
32. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Distribuição Das Epizootias Ocorridas Em PNH e Classificação e Percentual de Cobertura Vacinal 1 Para Febre Amarela, Segundo Município e URS de Ocorrência, Minas Gerais, Período de Monitoramento 2 2022–2023. Available online: <https://www.saude.mg.gov.br/images/2023/Arquivos%20FA/31-10/Distribui%C3%A7%C3%A3o%20das%20epizootias%20ocorridas%20em%20PNH%202022-2023%20em%20MG%20-%2010.09.2023.pdf> (accessed on 4 October 2023).
33. de Rezende, I.M.; Sacchetto, L.L.; Munhoz de Mello, E.; Alves, P.A.; Iani, F.C.d.M.; Adelino, T.E.R.; Duarte, M.M.; Cury, A.L.E.; Bernardes, A.E.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] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.