



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Sabrina Fernandes Cardoso

**Febre amarela: Desenvolvimento e validação de ensaio molecular do tipo RT-LAMP e
investigação dos vetores silvestres no estado de Santa Catarina, Brasil.**

Florianópolis

2025

Sabrina Fernandes Cardoso

Febre amarela: Desenvolvimento e validação de ensaio molecular do tipo RT-LAMP e investigação dos vetores silvestres no estado de Santa Catarina, Brasil.

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Orientadora: Prof.^a Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dra.
Coorientador: André Nóbrega Pitaluga, Dr.

Florianópolis

2025

Ficha de identificação da obra

Fernandes Cardoso, Sabrina

Febre amarela: Desenvolvimento e validação de ensaio molecular do tipo RT-LAMP e investigação dos vetores silvestres no estado de Santa Catarina, Brasil. / Sabrina Fernandes Cardoso ; orientadora, Luísa Damazio Rona Pitaluga, coorientadora, André Nóbrega Pitaluga, 2025.

78 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Febre amarela. I. Damazio Rona Pitaluga, Luísa . II. Nóbrega Pitaluga, André . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Sabrina Fernandes Cardoso

Febre amarela: Desenvolvimento e validação de ensaio molecular do tipo RT-LAMP e investigação dos vetores silvestres no estado de Santa Catarina, Brasil.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 26 de setembro de 2025, por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Dr.
FIOCRUZ/RJ

Prof. José Henrique Maia Campos de Oliveira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Juliana Dal-Ri Lindenau, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof. Guilherme Toledo e Silva, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis, 2025.

Dedico este trabalho a minha mãe, Silvana Fernandes do Carmo.

Meu exemplo de vida, coragem e força.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela força nos momentos de cansaço, pelo amparo nas dificuldades e pela proteção constante ao longo desta jornada. Sou também profundamente grata pelas pessoas especiais que se colocaram em meu caminho, contribuindo de diferentes formas para minha trajetória acadêmica.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Luísa Damazio Rona Pitaluga, e ao coorientador, Dr. André Nóbrega Pitaluga, pela confiança, incentivo e orientação firme, exercendo não apenas o papel de pesquisadores de excelência, mas também de verdadeiros amigos. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Dr.^a Juliana Dal-Ri Lindenau, Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira, Dr. Guilherme Toledo e Silva, Dr.^a Josiane Somariva Prophiro e Dr.^a Greicy Brisa Malaquias, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

Ao PPGBCD/UFSC, pela oportunidade de formação qualificada. Aos colegas do Laboratório Rona-Pitaluga, pela parceria e companheirismo, especialmente ao André Akira, à Iara Pinheiro e à Larissa Akemi pelo apoio científico e pessoal.

Aos pesquisadores da FIOCRUZ/RJ, Me. Maycon Sebastião Alberto Santos Neves e Dr.^a Dinair Couto-Lima, pela colaboração fundamental nas identificações e experimentos. À Renata Rísoli Gatti (DIVE/SC), pelo suporte logístico e incentivo. Ao Laboratório de Imunoparasitologia da UNISUL, em especial à Dr.^a Josiane Somariva Prophiro, pela infraestrutura disponibilizada. Aos gestores, equipes de vigilância e agentes de combate às endemias dos municípios parceiros, pela colaboração nas atividades de campo.

Ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (Uniedu), pela concessão de bolsa de estudos;

À minha família, pelo apoio incondicional e compreensão diante das ausências, em especial à minha mãe, Silvana Fernandes do Carmo, e ao meu pai afetivo, Alexandre Nunes do Carmo.

E, por fim, ao Rodrigo Mainieri Zandavalle, pelo amor, companheirismo e incentivo constantes, por ser meu porto seguro e me ajudar a seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

“Aquele que supõe conhecer sobre algo, que demonstra uma grande segurança sobre o que diz, se fecha para novos conhecimentos, pois acredita que não tem nada mais a saber.”

(Sócrates)

RESUMO

A febre amarela é uma arbovirose aguda, causada pelo vírus da febre amarela (YFV), um membro da família *Flaviviridae*. Trata-se de uma zoonose de elevada gravidade clínica que é transmitida por culicídeos. A doença permanece como uma ameaça significativa à saúde pública no Brasil, com impactos expressivos para populações humanas e de primatas não humanos (PNH). Esta tese teve como objetivo desenvolver e validar um ensaio molecular do tipo RT-LAMP para diagnóstico do YFV e investigar os potenciais vetores silvestres envolvidos em sua transmissão no estado de Santa Catarina (SC). No primeiro capítulo, foi padronizado e validado um protocolo de RT-LAMP em amostras de PNH, que demonstrou alta sensibilidade e especificidade, apresentando-se como alternativa viável e de baixo custo frente à RT-qPCR, com potencial aplicação em vigilância descentralizada. O segundo capítulo descreveu, pela primeira vez, a ocorrência de *Haemagogus leucocelaenus* no Sul de SC, ampliando o conhecimento sobre sua distribuição geográfica. Além disso, evidências quanto a variações morfológicas dentre os espécimes capturados de *Hg. leucocelaenus* foram relatadas. Diante disso, a tese traz sequências inéditas de DNA barcode da espécie para a região. No terceiro capítulo, foram analisadas mais de 4.300 fêmeas de culicídeos coletadas em municípios afetados pelo surto de febre amarela silvestre, identificando ao menos 32 espécies, incluindo *Hg. leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus*. Este último, apresentou o primeiro registro de infecção natural pelo YFV no Sul do Brasil, com elevada taxa mínima de infecção, sugerindo seu papel como vetor secundário, enquanto *Hg. leucocelaenus* provavelmente atuou como vetor primário. Os resultados desta tese contribuem para o avanço do diagnóstico molecular, da entomologia médica e da vigilância epidemiológica, destacando a necessidade de fortalecimento da cobertura vacinal e da vigilância integrada em áreas de risco.

Palavras-chave: febre amarela; RT-LAMP; *Haemagogus leucocelaenus*; *Sabethes albiprivus*; vigilância entomológica.

ABSTRACT

Yellow fever is an acute arbovirus caused by the yellow fever virus (YFV), a member of the Flaviviridae family. It is a highly clinically severe zoonosis transmitted by mosquitoes. The disease remains a significant public health threat in Brazil, with significant impacts on human and nonhuman primate (NHP) populations. This thesis aimed to develop and validate a molecular RT-LAMP assay for diagnosing YFV and investigating potential wild vectors involved in its transmission in the state of Santa Catarina (SC). The first chapter standardized and validated an RT-LAMP protocol in NHP samples, demonstrating high sensitivity and specificity, presenting itself as a viable and low-cost alternative to RT-qPCR, with potential application in decentralized surveillance. The second chapter described, for the first time, the occurrence of *Haemagogus leucocelaenus* in southern Santa Catarina, expanding knowledge of its geographic distribution. Furthermore, evidence of morphological variations among captured *Hg. leucocelaenus* specimens was reported. Therefore, the thesis presents unprecedented DNA barcode sequences of the species for the region. In the third chapter, more than 4,300 female Culicidae collected in municipalities affected by the sylvatic yellow fever outbreak were analyzed, identifying at least 32 species, including *Hg. leucocelaenus* and *Sabethes albiprivus*. The latter presented the first record of natural YFV infection in southern Brazil, with a high minimum infection rate, suggesting its role as a secondary vector, while *Hg. leucocelaenus* likely acted as a primary vector. The results of this thesis contribute to the advancement of molecular diagnostics, medical entomology, and epidemiological surveillance, highlighting the need to strengthen vaccination coverage and integrated surveillance in risk areas.

Keywords: yellow fever; RT-LAMP; *Haemagogus leucocelaenus*; *Sabethes albiprivus*; entomological surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do vírus da febre amarela.	15
Figura 2 – Primers usados na reação de LAMP.	17
Figura 3 – Ciclos de transmissão da febre amarela.	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA – Bahia

BIP – Iniciador interno reverso

B3 – Iniciador externo reverso

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

ES – Espírito Santo

FIP – Iniciador interno direto

F3 – Iniciador externo direto

Kb – Kilobase

LAMP – Amplificação isotérmica mediada por *loop*

MG – Minas Gerais

NS – Não estruturais

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PNH – Primatas não humanos

POC – Point of care

PR – Paraná

RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcrição reversa

SC – Santa Catarina

SP – São Paulo

YFV – Vírus da febre amarela

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

H⁺ – prótons de hidrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O VÍRUS DA FEBRE AMARELA	14
1.2	DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA.....	16
1.3	FEBRE AMARELA.....	18
1.3.1	Febre amarela em Santa Catarina	20
1.4	VETORES DA FEBRE AMARELA	20
1.5	JUSTIFICATIVA.....	23
1.6	OBJETIVOS.....	24
1.6.1	Objetivo Geral	24
1.6.2	Objetivos Específicos	24
2	METODOLOGIA	26
3	RESULTADOS	27
3.1	CAPÍTULO I – DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RT-LAMP FOR DETECTING YELLOW FEVER VIRUS IN NON-HUMAN PRIMATES SAMPLES FROM BRAZIL.....	28
3.1.1	Material Suplementar do Capítulo I	39
3.2	CAPÍTULO II – EXPANDED RANGE OF <i>HAEMAGOGUS LEUCOCELAENUS</i> IN YELLOW FEVER HOTSPOTS: NEW FINDINGS FROM SANTA CATARINA STATE, SOUTHERN BRAZIL.	43
3.3	CAPÍTULO III – ASSESSING THE SYLVATIC YELLOW FEVER VECTORS IN SOUTHERN BRAZIL	51
4	DISCUSSÃO GERAL	68
5	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – GALERIA DE FOTOS	76

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por arbovírus representam, historicamente, um relevante desafio para a saúde pública em países e regiões de clima tropical e subtropical. Embora, por muito tempo, essas enfermidades tenham sido consideradas contribuintes secundárias para os índices globais de mortalidade e incapacidade, o cenário epidemiológico das últimas décadas tem modificado substancialmente essa percepção. O surgimento de surtos epidêmicos de arboviroses em proporções sem precedentes evidenciou a gravidade potencial dessas doenças. Um exemplo emblemático é o da febre amarela, que, após um período de relativa obscuridade, reemergiu com intensidade suficiente para ser classificada como Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional. Dessa forma, pesquisas direcionadas ao estudo da febre amarela assumem papel estratégico, apresentando significativa relevância científica, epidemiológica e em saúde pública. Diante disso, neste trabalho, propôs-se a padronização e a validação de um ensaio molecular por meio da técnica de LAMP, visando ao diagnóstico rápido da febre amarela. Adicionalmente, buscou-se investigar os potenciais vetores envolvidos na transmissão do vírus da febre amarela no estado de Santa Catarina, Brasil.

Esta seção tem por objetivo apresentar uma visão geral sobre a febre amarela, abordando aspectos fundamentais para o entendimento deste trabalho. São discutidos temas, como: o agente etiológico da doença, sua estrutura viral, os principais métodos de diagnóstico molecular atualmente empregados, bem como características dos vetores envolvidos no ciclo de transmissão da doença.

1.1 O VÍRUS DA FEBRE AMARELA

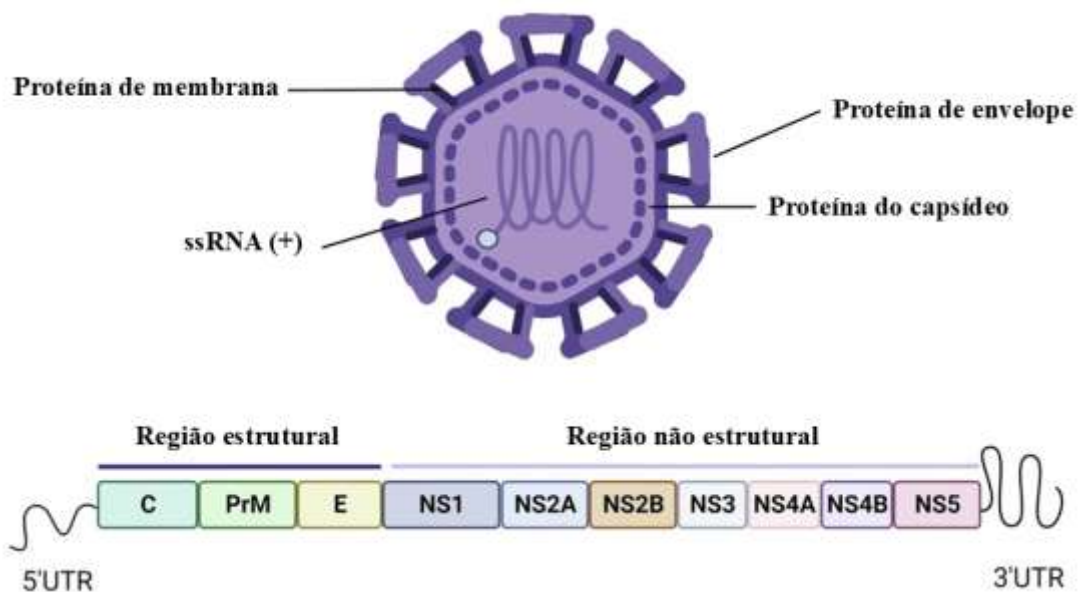
Orthoflavivirus flavi é o agente etiológico da Febre amarela, é classificado na família *Flaviviridae* e no gênero *Orthoflavivirus* (Postler *et al.*, 2023). O Vírus amarelo teve origem na África e se espalhou para as Américas e o Caribe, provavelmente entre os séculos XVII e XIX. Foi isolado pela primeira vez do sangue de um paciente ganês em 1927 (Franco, 1969). A transmissão do vírus da febre amarela (YFV) ocorre pela hematofagia de fêmeas infectadas de mosquitos da família *Culicidae* em hospedeiros suscetíveis (Monath; Vasconcelos, 2015).

O genoma do YFV é composto por um RNA de sentido positivo de fita simples, com aproximadamente 11 kb de comprimento, composto por 10 genes, sendo: três estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS), a saber: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, que codifica dez proteínas com o mesmo nome (Nunes *et al.*, 2015) (Figura 1).

Atualmente, são descritas sete cepas do YFV, sendo cinco identificadas no continente africano: África Ocidental I e II, África Oriental, África Oriental/Central e Angola e duas nas Américas: América do Sul I e II (Faria *et al.*, 2025). No Brasil, o genótipo América do Sul I é o mais frequentemente registrado. Dentro desse genótipo, foram reconhecidas cinco linhagens distintas, denominadas de 1A a 1E, as quais têm sido associadas a surtos epidêmicos ocorridos durante os ciclos de expansão e retração da circulação do YFV no Brasil e em outros países tropicais do continente americano. Desde o início do século XXI, as linhagens 1D e 1E foram detectadas em território brasileiro. Contudo, a partir de 2008, apenas vírus pertencentes à linhagem 1E têm sido identificados no país (Bonaldo *et al.*, 2017). Estudos filogenéticos forneceram evidências de que o YFV que circula nas Américas é derivado de um ancestral da linhagem da África Ocidental, que surgiu na África e foi importado para a costa leste americana da África Ocidental durante o comércio de escravos (Faria *et al.*, 2025).

Análises genômicas indicam que o YFV que circulou no Brasil entre 2014 e 2021 pertence ao genótipo sul-americano 1E, o qual se subdivide em duas sublinhagens originadas na região do Cerrado, no estado de Goiás. A primeira sublinhagem, denominada YFVMG/ES/RJ/BA, deslocou-se de oeste para leste através de Minas Gerais (MG), alcançando os estados do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e Bahia (BA). A segunda sublinhagem, denominada YFVMG/SP/RS, também atravessou o oeste de MG, avançou para o estado de São Paulo (SP) e, posteriormente, atingiu os estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) (Delatorre *et al.*, 2019).

Figura 1 – Estrutura do vírus da febre amarela.



Fonte: Adaptado pela autora de Madere *et al.* (2025).

1.2 DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

O diagnóstico da infecção pelo YFV apresenta considerável complexidade, uma vez que os sintomas iniciais da doença são inespecíficos e se assemelham aos de diversas outras enfermidades. Sendo assim, a confirmação laboratorial torna-se fundamental para o diagnóstico diferencial da febre amarela, especialmente em relação a doenças com manifestações clínicas semelhantes, como: leptospirose, malária, hepatites virais e outras febres hemorrágicas (Escadafal *et al.*, 2014).

Laboratorialmente, a febre amarela pode ser diagnosticada por métodos virológicos, como a detecção do genoma viral, identificação de antígenos ou isolamento do vírus, e por métodos sorológicos. Amostras biológicas como sangue total, soro e/ou tecidos são comumente utilizados para a realização desses testes (Brasil, 2018; PAHO, 2018).

No que se refere aos testes sorológicos, a detecção de anticorpos IgM específicos contra o YFV pode ser realizada por meio de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou por outros imunoenaios, como a imunofluorescência indireta. No entanto, tais métodos apresentam limitações importantes, sobretudo em decorrência da reatividade cruzada entre membros do gênero *Orthoflavivirus*, especialmente com os vírus da dengue. Em regiões endêmicas, onde a exposição prévia a diferentes flavivírus é comum, essa reatividade cruzada compromete a especificidade dos testes. Adicionalmente, a resposta imunológica em infecções secundárias por flavivírus pode resultar em baixos títulos de anticorpos IgM, os quais são frequentemente detectáveis apenas nos primeiros dois a três dias após o início da infecção, por vezes em níveis próximos ao limite de sensibilidade do ensaio IgM-ELISA, o que compromete sua utilidade como marcador confiável (Monath; Vasconcelos, 2015).

Dentre os ensaios utilizados para a detecção virológica, destacam-se as análises moleculares, nas quais o RNA viral pode ser identificado por meio da reação de transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Brasil, 2018; PAHO, 2018). No entanto, o método é caro, necessitando de equipamentos específicos de ciclagem térmica, infraestrutura e profissionais qualificados, não sendo compatíveis com aplicações *point of care* (POC) (Diego *et al.*, 2021). Sendo assim, geralmente o diagnóstico é realizado em laboratórios centrais de referência. Essa dependência de infraestrutura especializada contribui para a morosidade do processo diagnóstico (Nunes *et al.*, 2015).

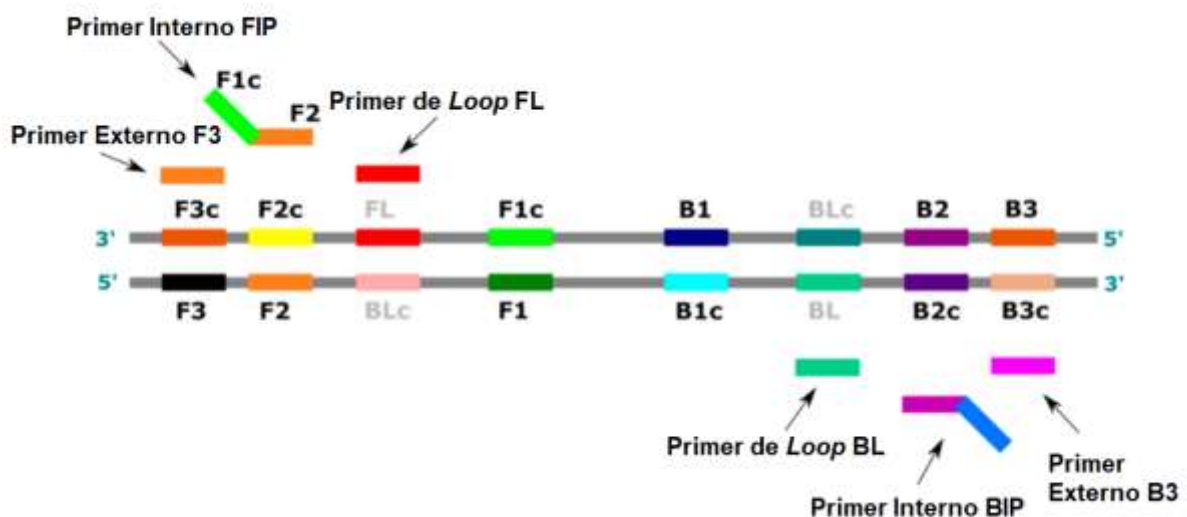
A análise histopatológica associada à imunohistoquímica, realizada em cortes de fígado e de outros tecidos, constitui um método eficaz para o diagnóstico da febre amarela em casos fatais. No entanto, assim como a RT-PCR, esse exame é realizado, em geral, em

laboratórios de referência localizados distantes do ponto de atendimento ao paciente. Além disso, outras metodologias diagnósticas podem ser empregadas, como o isolamento viral por meio da inoculação em camundongos ou em culturas celulares. Contudo, devido à sua complexidade e aos requisitos laboratoriais específicos, essa técnica é raramente utilizada como ferramenta de diagnóstico de primeira escolha (PAHO, 2018).

Nesse contexto, a técnica de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) apresenta-se como uma alternativa promissora para a geração de dados e respostas voltadas ao monitoramento de enfermidades, incluindo aquelas transmitidas por vetores. Essa metodologia destaca-se por ser rápida, sensível e economicamente viável, permitindo a amplificação de material genético sob condições isotérmicas (Mori; Notomi, 2009; Notomi *et al.*, 2000).

O método LAMP utiliza a enzima *Bst* DNA polimerase e quatro primers principais, dois internos (FIP e BIP) e dois externos (F3 e B3), que reconhecem seis regiões distintas da sequência-alvo, conferindo elevada sensibilidade à reação. A técnica é capaz de amplificar grandes quantidades de DNA em curto tempo, sob condições isotérmicas entre 60 e 65 °C. Adicionalmente, a inclusão de primers adicionais, como os do tipo *loop*, pode aumentar ainda mais a sensibilidade do ensaio (Notomi *et al.*, 2000; Mori; Notomi, 2009). Ademais, a adição da transcriptase reversa permite amplificar o DNA a partir de sequências de RNA (RT-LAMP) (Mori; Notomi, 2009) (Figura 2).

Figura 2 – Primers usados na reação de LAMP.



Fonte: Adaptado pela autora de Soroka, Wasowicz e Rymaszewska (2021).

Durante a reação de amplificação por LAMP, ocorre a liberação de íons pirofosfato como subproduto, os quais se combinam com íons magnésio presentes na mistura, formando

um precipitado branco de pirofosfato de magnésio. Essa formação permite a detecção visual da amplificação, em tempo real, pela simples observação da turbidez, eliminando a necessidade de eletroforese. Além disso, a amplificação do alvo resulta na liberação de prótons de hidrogênio (H^+), promovendo acidificação do meio. Essa variação de pH pode ser detectada com o uso de corantes indicadores, que mudam de cor em resposta à alteração, permitindo uma leitura direta do resultado (Mori; Notomi, 2009).

Um ensaio de RT-LAMP foi desenvolvido por Kwallah *et al.* (2013) para a detecção do genoma do YFV, apresentando bons níveis de sensibilidade e especificidade. Contudo, os testes foram restritos à utilização da cepa vacinal 17D, o que limita a aplicabilidade dos resultados em contextos envolvendo cepas selvagens. Em outro estudo, Nunes *et al.* (2015) propuseram um protocolo de RT-LAMP para a detecção do YFV, também com desempenho satisfatório. No entanto, os primers utilizados foram desenhados com base em cepas brasileiras com mais de duas décadas de isolamento, e os ensaios não foram validados com amostras provenientes de campo, o que compromete a representatividade dos resultados em situações epidemiológicas atuais.

1.3 FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença infecciosa grave, não contagiosa, emergente e zoonótica, que afeta tanto seres humanos quanto primatas não humanos (PNH), apresentando alta taxa de letalidade nos indivíduos infectados (Mcarthur, 2019; Vasconcelos, 2003). O espectro clínico da febre amarela varia de infecção assintomática ou leve a quadros graves potencialmente fatais com hemorragia e icterícia (PAHO, 2018). A doença evolui em três estágios: prodrômico, de remissão e toxêmico. O estágio prodrômico é caracterizado por sintomas inespecíficos, como febre, mialgia, náuseas e vômito. Durante o período de remissão, ocorre uma breve melhora clínica, seguida pela possibilidade de recuperação completa ou progressão para o estágio toxêmico. Este último, é marcado pelo agravamento da doença e o desenvolvimento de insuficiência hepatorrenal, evidenciada por icterícia, oligúria e albuminúria (PAHO, 2025).

A febre amarela é considerada endêmica nas Américas, especialmente na América do Sul, e na África, com predomínio nas regiões tropicais. Embora vacinas seguras e eficazes estejam disponíveis desde 1937, grandes epidemias de febre amarela ocorreram na África e na América do Sul, em áreas sem histórico de imunidade, seja adquirida naturalmente ou por meio da vacinação. A ausência de uma barreira imunológica na população humana constitui um fator

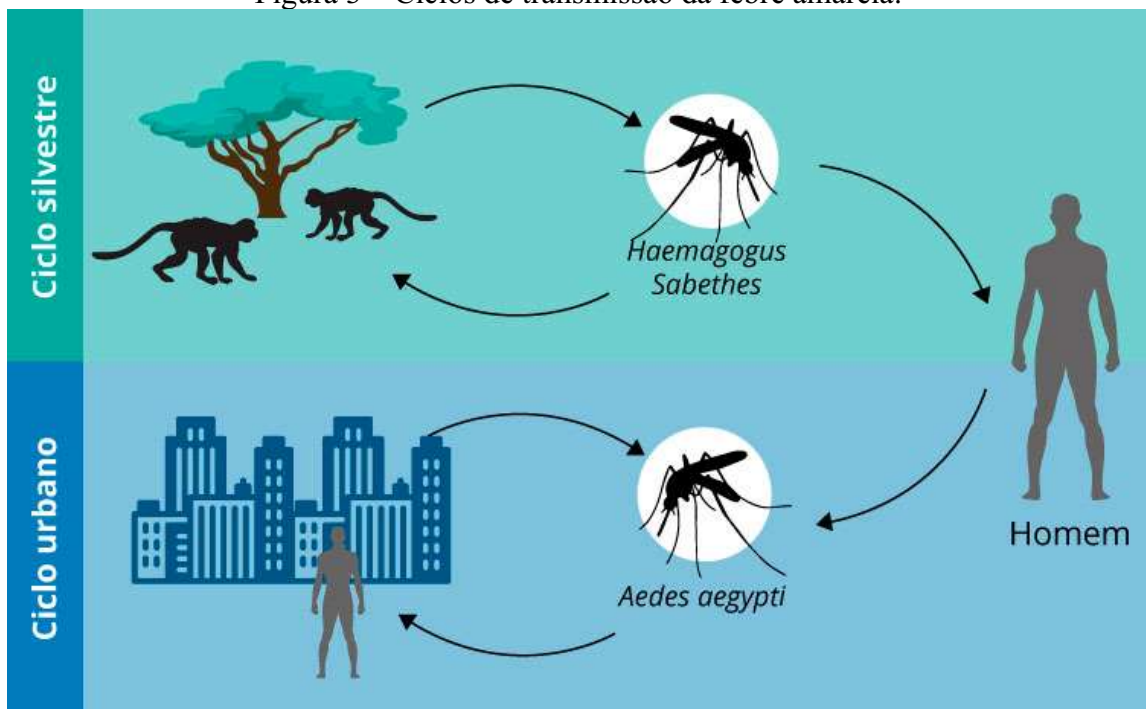
determinante, mas as causas subjacentes à amplificação do vírus permanecem pouco compreendidas, sendo de natureza multifatorial (Monath; Vasconcelos, 2015).

No Brasil, a doença apresenta dois ciclos de transmissão distintos: o ciclo silvestre que acontece entre mosquitos silváticos e PNH e o ciclo urbano que se desenvolve entre mosquitos da espécie *Aedes aegypti* e o homem (Figura 3). Não há casos relatados do ciclo de transmissão urbana no país desde 1942. A infecção humana, no ciclo silvestre, ocorre de forma acidental, geralmente por exposição a ambientes nos quais o vírus está em circulação. (Abreu *et al.*, 2019).

Os macacos neotropicais demonstram ampla suscetibilidade à infecção pelo YFV. Estudos experimentais, indicam que todos os gêneros de PNH testados, tornam-se infectados após a inoculação laboratorial do vírus, incluindo o macaco bugio, pertencente ao gênero *Alouatta*. Os PNH desse gênero são considerados os principais hospedeiros e amplificadores do YFV, apresentando elevada suscetibilidade viral e desenvolvendo quadro clínico grave e frequentemente fatal, semelhante ao observado em humanos (Almeida *et al.*, 2011).

No Brasil, a vigilância da febre amarela está estruturada em três eixos principais: vigilância de casos humanos, vigilância entomológica e vigilância de epizootias em PNH. Entre esses componentes, os eventos epizooticos envolvendo PNHs são considerados indicadores sentinelas fundamentais para a detecção precoce da circulação do vírus e, conseqüentemente, para a prevenção de casos humanos (Brasil, 2014).

Figura 3 – Ciclos de transmissão da febre amarela.



Fonte: Ministério da Saúde (2018).

A floresta tropical da região amazônica é endêmica para o YFV, com circulação viral constante. No entanto, ondas de expansão da febre amarela silvestre foram relatadas além da Amazônia, atingindo outros biomas, como o Cerrado e a Mata Atlântica (Oliveira *et al.*, 2023). Desde os anos 2000, a invasão desses biomas tem gerado surtos, com grande impacto para a saúde pública (Possas *et al.*, 2018). Entre 2014 e 2021, o Brasil vivenciou a maior epidemia de febre amarela dos últimos 80 anos, com 2.267 casos humanos e inúmeras epizootias em PNH. O YFV, após se espalhar pela Amazônia e atravessar o Cerrado entre 2014 e 2016, atingiu a Mata Atlântica da Região Sudeste, área considerada livre do vírus desde a década de 1940. Este surto, ocorrido principalmente entre 2016 e 2018, resultou em 752 mortes humanas. De 2018 a 2021, o vírus continuou sua propagação pela Mata Atlântica, alcançando a Região Sul e o limite meridional de sua distribuição (Oliveira *et al.*, 2023).

1.3.1 Febre amarela em Santa Catarina

Entre 2019 e julho de 2025, foram confirmados 27 casos humanos de febre amarela em SC, dos quais oito evoluíram para óbito, representando uma taxa de letalidade de aproximadamente 30%. No mesmo período, foram identificadas 254 epizootias de PNH positivas para o YFV. Contudo, o número real de animais acometidos é superior, uma vez que determinadas notificações envolveram mais de um indivíduo por ocorrência. Dos 293 municípios catarinenses, 55 apresentaram registros de circulação viral. Ressalta-se que os casos autóctones da doença foram registrados nos anos de 2019, 2020 e 2021 (DIVE, 2025).

É importante destacar que os números aqui apresentados podem estar subestimados, em virtude da subnotificação, uma vez que os sinais clínicos iniciais da febre amarela, tais como: febre, calafrios, cefaleia, mialgia, fadiga e fraqueza, são inespecíficos e facilmente confundidos com outras enfermidades infecciosas. Os sintomas clássicos e mais amplamente divulgados da febre amarela, como icterícia e manifestações hemorrágicas, geralmente ocorrem apenas nas fases mais graves da doença, quando já há comprometimento sistêmico avançado, com lesões em órgãos vitais como fígado e rins, dificultando o diagnóstico precoce e acurado da enfermidade (Brasil, 2018).

1.4 VETORES DA FEBRE AMARELA

A família Culicidae compreende um grupo taxonômico extenso e cosmopolita de mosquitos, englobando mais de 3.700 espécies distribuídas em 113 gêneros, com ocorrência

em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo (Harbach, 2025). Embora diversas espécies de mosquitos neotropicais tenham sido identificadas como portadoras do YFV, sob a perspectiva epidemiológica, determinadas espécies pertencentes aos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes* têm sido consideradas vetores potenciais ou competentes para a transmissão do vírus (Forattini, 2002).

No Brasil, o *Aedes aegypti* é reconhecido como o único vetor comprovado da febre amarela em áreas urbanas (Consoli; Oliveira, 1994). Embora essa espécie, por si só, já representasse um risco significativo, a introdução do *Aedes albopictus* no território brasileiro, a partir do final da década de 1980 e sua subsequente disseminação, intensificaram a ameaça de surtos urbanos de febre amarela. Adicionalmente, evidências experimentais, demonstram que determinadas populações brasileiras de *Ae. albopictus*, originárias da região da costa atlântica, apresentam elevada suscetibilidade às cepas do YFV das linhagens americanas e africanas (Couto-Lima *et al.*, 2017). O mesmo estudo reforça que *Ae. aegypti* mantém sua suscetibilidade ao YFV, corroborando seu papel epidemiológico como vetor primário na transmissão deste arbovírus no ciclo urbano. Recentemente, *Ae. albopictus* foi identificado naturalmente infectado pelo YFV, o que acende um alerta quanto à possibilidade de ressurgimento da transmissão urbana da doença, com essa espécie atuando como um potencial vetor de ponte entre os ciclos silvestre e urbano (Cruz *et al.*, 2023). Outras espécies pertencentes ao gênero *Aedes*, como *Aedes taeniorhynchus* e *Aedes scapularis*, também já foram identificadas como portadoras do YFV, o que reforça a relevância epidemiológica desse gênero na dinâmica de transmissão da doença (Abreu *et al.*, 2020).

No ciclo silvestre da febre amarela, a infecção humana ocorre por meio da picada de mosquitos dos gêneros *Haemagogus* (vetores primários) e *Sabethes* (vetores secundários), os quais habitam predominantemente o dossel das florestas (Couto-Lima *et al.*, 2017).

Entre as espécies do gênero *Haemagogus* que foram incriminadas como vetores da febre amarela silvestre estão *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus equinus*, *Haemagogus lucifer*, *Haemagogus mesodentatus*, *Haemagogus spegazzinii*, *Haemagogus leucocelaenus* e *Haemagogus capricornii* (Telles-de-Deus *et al.*, 2024).

No âmbito do gênero *Haemagogus*, a espécie *Hg. janthinomys* destaca-se como o principal vetor da febre amarela no ambiente silvestre. As observações relacionadas ao papel dessa espécie na transmissão do YFV, foram fundamentais para a formulação do conceito de transmissão silvestre da doença no Brasil (Consoli; Oliveira, 1994). *Hg. janthinomys* já foi identificado naturalmente infectado pelo YFV diversas vezes, evidenciando sua importância enquanto vetor no ciclo silvestre da doença (Abreu *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2020; Cruz *et al.*,

2023; Pinheiro *et al.*, 2019). A espécie ocorre desde o norte da Argentina e o Sul do Brasil até Honduras e Nicarágua, distribuindo-se ao longo da costa atlântica, estando ausente no litoral do Pacífico sul-americano. Sua área de ocorrência abrange todos os estados brasileiros situados ao norte do Paraná, regiões a leste dos Andes, do Peru à Colômbia, toda a Venezuela, as três Guianas e Trinidad e Tobago. Predomina quase exclusivamente em florestas tropicais úmidas primárias e em suas áreas adjacentes (Consoli; Oliveira, 1994). Li *et al.* (2022) modelaram e mapearam a adequação ambiental dos principais vetores do YFV no Brasil, incluindo espécies do gênero *Haemagogus*, identificando o Estado catarinense como uma área de alta adequação para essas espécies. Contudo, foi relatada uma pseudoausência de *Hg. janthinomys* nessa região, atribuída à ausência de registros de vetores no referido estado.

Investigações entomológicas conduzidas durante o surto de febre amarela silvestre, registrado entre 2014 e 2021, identificaram os mosquitos *Hg. janthinomys* e *Haemagogus leucocelaenus*, como os principais vetores do YFV nas regiões do sudeste da Mata Atlântica (Abreu *et al.*, 2019). *Haemagogus leucocelaenus* parece se estender de Trinidad ao Sul do Brasil e ao Norte da Argentina. É um mosquito essencialmente diurno e acrodendrófilo, criando-se em buracos de árvore e internódios de bambu (Consoli; Oliveira, 1994). A espécie já foi encontrada infectada naturalmente pelo YFV no Brasil, inclusive no RS, reforçando sua relevância epidemiológica como vetor silvestre (Abreu *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2003).

Os culicídeos do gênero *Sabethes* são exclusivamente diurnos, silvestres, frequentemente acrodendrófilos e criam-se em recipientes naturais, quase sempre em buracos de árvore, internódios de bambu e axilas de folhas (Consoli; Oliveira, 1994). As espécies desse gênero são regularmente detectadas em inquéritos entomológicos realizados no Brasil (Abreu *et al.*, 2019; Deus *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2023), incluindo registros em estados da Região Sul (Guimarães *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2003). A importância epidemiológica do gênero *Sabethes* é evidenciada por registros de infecção natural pelo YFV em: *Sabethes chloropterus* (Abreu *et al.*, 2020) e *Sabethes albiprivus* (Goenaga *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2023), *Sabethes belisário*, *Sabethes cyaneus*, *Sabethes glaucodaemon*, *Sabethes soperi* e *Sabethes identicus* reforçando o papel potencial dessas espécies na manutenção e transmissão silvestre do vírus (Bersot *et al.*, 2023).

O conhecimento sobre a fauna de culicídeos silvestres no estado de SC é ainda limitado, como evidenciado pela escassez de registros disponíveis na literatura (Ferreira-de-Freitas *et al.*, 2016). Além disso, os estudos realizados até o momento não contemplam a

investigação da infecção natural pelo YFV nessa região, configurando uma lacuna significativa no entendimento dos mosquitos que podem atuar como vetores locais.

1.5 JUSTIFICATIVA

A febre amarela permanece como um relevante problema de saúde pública nas Américas e na África, com potencial de causar surtos de grande magnitude, alta letalidade e impactos significativos em populações humanas e de PNH. No Brasil, a reemergência e a expansão geográfica do YFV nas últimas décadas, incluindo sua chegada a regiões historicamente livres da circulação viral, como partes da Região Sul, evidenciam a necessidade urgente de aprimoramento das estratégias de vigilância e diagnóstico.

O diagnóstico laboratorial rápido e preciso é um componente fundamental para o manejo oportuno de casos e para a implementação de medidas de controle. Atualmente, a reação de RT-PCR, constitui o padrão ouro para a detecção do genoma viral do YFV. Entretanto, sua aplicação ampla é limitada por custos elevados, dependência de infraestrutura laboratorial especializada e necessidade de profissionais altamente capacitados. Essas restrições, comprometem a agilidade diagnóstica em cenários de campo, particularmente em regiões com menor acesso a laboratórios de referência.

Nesse contexto, a técnica de LAMP desponta como alternativa promissora, pois alia alta sensibilidade e especificidade à simplicidade operacional, menor custo e possibilidade de aplicação em condições de infraestrutura limitada. A literatura científica já demonstrou a eficácia de LAMP na detecção de diversos patógenos virais, incluindo o YFV, mas os estudos existentes apresentam limitações, como uso único de cepas vacinais nos testes ou ausência de validação com amostras de campo recentes. Dessa forma, a hipótese 1 parte da premissa de que, sendo a técnica de LAMP operacionalmente mais prática e viável que a RT-PCR, esta poderá apresentar desempenho diagnóstico equivalente ao do método de referência, contribuindo para a descentralização e agilização da detecção do YFV.

Paralelamente, a identificação dos vetores é essencial para a prevenção e controle da febre amarela, especialmente no ciclo silvestre, cuja interrupção ainda não é viável. Estudos apontam espécies dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* como principais responsáveis pela transmissão silvestre do YFV no Brasil, com registro de infecção natural e ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Apesar disso, no Estado de SC, as informações sobre a fauna de culicídeos silvestres e sua possível participação na transmissão local do vírus são escassas, configurando uma lacuna epidemiológica relevante. A hipótese 2 considera que as

principais espécies desses gêneros, reconhecidas nacionalmente como vetores competentes, também tenham desempenhado papel central na disseminação do YFV no território catarinense, especialmente durante os eventos epidêmicos registrados nos últimos anos. Assim, a investigação proposta reveste-se de importância científica, epidemiológica e operacional, pois integra o desenvolvimento e a validação de um método molecular alternativo de diagnóstico rápido, juntamente com a caracterização dos possíveis vetores silvestres locais.

Os resultados poderão subsidiar políticas públicas de vigilância mais ágeis e direcionadas, contribuindo para a mitigação do risco de novos surtos, bem como para a preservação da saúde humana e da fauna silvestre.

1.6 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta tese.

1.6.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um ensaio molecular do tipo RT-LAMP para o diagnóstico do YFV e identificar as espécies de culicídeos silvestres em uma microrregião do Sul de Santa Catarina, Brasil.

1.6.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver o diagnóstico molecular do YFV por meio da técnica de RT-LAMP;
- b) Padronizar o ensaio de RT-LAMP para diagnóstico do YFV;
- c) Validar o teste de RT-LAMP com amostras de campo, provenientes de epizootias de PNH;
- d) Determinar o limite de detecção do teste proposto (sensibilidade analítica);
- e) Detectar se o teste apresenta reação cruzada com outros Flavivirus (especificidade analítica);
- f) Identificar as espécies de culicídeos silvestres em uma microrregião do Sul de Santa Catarina;
- g) Averiguar a infecção natural pelo YFV, por meio da técnica de RT-LAMP, nos culicídeos silvestres capturados;

- h) Apontar os possíveis vetores da febre amarela silvestre em uma microrregião do Sul de Santa Catarina.

2 METODOLOGIA

As metodologias adotadas para a consecução do objetivo geral e dos objetivos específicos desta tese encontram-se descritas, de forma pormenorizada, nas seções de Materiais e Métodos dos artigos científicos elaborados ao longo do desenvolvimento do presente trabalho e publicados em periódicos especializados. Tal abordagem metodológica garante a rastreabilidade e a reprodutibilidade dos procedimentos experimentais, critérios indispensáveis à validação e à confiabilidade dos resultados obtidos. Ademais, a divulgação em periódicos científicos de reconhecida credibilidade assegura que essas metodologias tenham sido submetidas a um rigoroso processo de avaliação por pares, conferindo robustez e legitimidade às estratégias empregadas. Outrossim, essa prática fomenta a transparência científica, permitindo que outros pesquisadores repliquem, comparem ou ampliem os achados, consolidando, assim, o corpo de conhecimento na área de estudo.

3 RESULTADOS

Os resultados alcançados no presente estudo estão estruturados em três capítulos, cada um correspondendo a um artigo científico. Desses, dois já foram publicados em periódicos especializados de reconhecida relevância na área, enquanto o terceiro encontra-se em fase final de elaboração para posterior submissão. Em todas as publicações, a autora desta tese figura como primeira autora, o que evidencia sua participação intelectual predominante em todas as etapas do processo científico.

3.1 CAPÍTULO I – DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RT-LAMP FOR DETECTING YELLOW FEVER VIRUS IN NON-HUMAN PRIMATES SAMPLES FROM BRAZIL.

Artigo científico: Development and validation of RT-LAMP for detecting yellow fever virus in non-human primates samples from Brazil.

Referência Bibliográfica: Cardoso SF, Yoshikawa AAG, Pinheiro IC, Granella LW, Couto-Lima D, Neves MSAS, Mansur DS, Pitaluga AN, Rona LDP. Development and validation of RT-LAMP for detecting yellow fever virus in non-human primates samples from Brazil. Sci Rep. 2024 Sep 28;14(1):22520. doi: 10.1038/s41598-024-74020-4.

Situação do manuscrito: Publicado na revista Scientific Reports.

O monitoramento da febre amarela em PNH constitui um sistema estratégico de alerta precoce para surtos silvestres da doença, desempenhando papel essencial na prevenção de infecções em humanos. No entanto, os métodos diagnósticos atualmente empregados, com ênfase na RT-PCR, caracterizam-se por sua elevada complexidade técnica e custo elevado. Diante desse cenário, o primeiro capítulo desta tese teve como objetivo a padronização e validação de um teste molecular para a detecção do YFV, cuja metodologia dispensa o uso de equipamentos sofisticados e onerosos, assim como a necessidade de profissionais altamente especializados para sua execução.

Os materiais suplementares referentes ao artigo apresentado no Capítulo I estão acessíveis na seção 3.1.1, ao final do manuscrito.



OPEN Development and validation of RT-LAMP for detecting yellow fever virus in non-human primates samples from Brazil

Sabrina F. Cardoso^{1,2}, Andre Akira Gonzaga Yoshikawa¹, Iara Carolini Pinheiro¹, Lucilene Wildner Granella³, Dinair Couto-Lima⁴, Maycon Sebastião Alberto Santos Neves⁴, Daniel Santos Mansur³, André N. Pitaluga^{5,6,7}✉ & Luísa D. P. Rona^{1,6,7}✉

Monitoring yellow fever in non-human primates (NHPs) is an early warning system for sylvatic yellow fever outbreaks, aiding in preventing human cases. However, current diagnostic tests for this disease, primarily relying on RT-qPCR, are complex and costly. Therefore, there is a critical need for simpler and more cost-effective methods to detect yellow fever virus (YFV) infection in NHPs, enabling early identification of viral circulation. In this study, an RT-LAMP assay for detecting YFV in NHP samples was developed and validated. Two sets of RT-LAMP primers targeting the YFV NS5 and E genes were designed and tested together with a third primer set to the NS1 locus using NHP tissue samples from Southern Brazil. The results were visualized by colorimetry and compared to the RT-qPCR test. Standardization and validation of the RT-LAMP assay demonstrated 100% sensitivity and specificity compared to RT-qPCR, with a detection limit of 12 PFU/mL. Additionally, the cross-reactivity test with other flaviviruses confirmed a specificity of 100%. Our newly developed RT-LAMP diagnostic test for YFV in NHP samples will significantly contribute to yellow fever monitoring efforts, providing a simpler and more accessible method for viral early detection. This advancement holds promise for enhancing surveillance and ultimately preventing the spread of yellow fever.

Keywords Diagnosis, Yellow fever virus, Yellow fever, RT-LAMP

Yellow fever (YF) is a reemerging zoonotic disease transmitted by mosquitoes that affects both humans and non-human primates (NHP)^{1,2}. The disease is caused by the yellow fever virus (YFV), which belongs to the *Flavivirus* genus. This genus also includes well-known viruses such as the Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV)³. YFV has a single-stranded, positive-sense RNA genome of approximately 11,000 nucleotides. This genome encodes a polyprotein with three structural proteins (capsid—C, membrane—M, and envelope—E) and seven non-structural proteins (NS1 to NS5)^{4,5}. YFV has seven known genotypes: five in Africa (West Africa I and II, East Africa, East/Central Africa, and Angola) and two in the Americas (South America I and II), with the South American genotypes originating from the West African ones⁶. In Brazil, the predominant genotype is South America I, which includes five distinct lineages (1A–1E). Historically, lineages 1A, 1B and 1C were common in South America until the mid-1990s, when they were largely replaced by the current lineages 1D and 1E^{6,7}.

The YF is sustained through two fundamental cycles: urban and sylvatic. In the urban cycle, *Aedes aegypti* transmits the virus to humans, while in the sylvatic cycle, various mosquito species, particularly those of the genera *Haemagogus* and *Sabethes*, play a crucial role in South America's transmission. The NHP serves as the primary sylvatic host for YFV and acts as a virus-amplifying and highly susceptible host². In recent years, the re-emergence of YFV has significantly impacted public health in Brazil. Since 2002, YFV has expanded its

¹Department of Cell Biology, Embryology, and Genetics, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil. ²Directorate of Epidemiological Surveillance (DIVE), Santa Catarina's State Health Secretary, Florianópolis, Brazil. ³Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil. ⁴Hematozoan Transmitting Mosquito Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁶National Institute of Science and Technology in Molecular Entomology, National Council for Scientific and Technological Development (INCT-EM, CNPq), Rio de Janeiro, Brazil. ⁷These authors jointly supervised this work: André N. Pitaluga and Luísa D. P. Rona. ✉email: pitaluga@ioc.fiocruz.br; luisa.rona@ufsc.br

circulation, spreading from the East towards the South of Brazil. During these outbreaks, thousands of NHP deaths were documented, and over 2100 human cases were reported, with a case fatality rate of approximately 30%⁸.

The focus of YF surveillance in Brazil is centered on three key areas: monitoring human cases, entomology, and epizootics in NHP⁹. Epizootic events involving YF are crucial for predicting and identifying human cases of the disease¹⁰. Therefore, NHP surveillance aims to reduce the morbidity and mortality associated with the disease by investigating suspected epizootics, identifying YFV circulation, and preventing its transmission to humans⁹. However, YFV detection is hampered because it is conducted in a few national reference laboratories far from the NHP epizootic sites, limiting detailed spatiotemporal tracking of YFV incidence in Brazilian microregions⁸.

The gold standard for detecting YFV RNA is molecular diagnostics using RT-qPCR¹¹. However, this method is costly, and requires specialized equipment and skilled personnel, making it incompatible with point-of-care (POC) applications¹². Consequently, such analyses are usually performed in central reference laboratories, prolonging the diagnostic process^{11,13}. The loop-mediated isothermal amplification technique (RT-LAMP)¹⁴ is a valuable, rapid, sensitive, and cost-effective alternative to the gold standard RT-qPCR for monitoring diseases. This nucleic acid amplification method works under isothermal conditions, with results visible to the naked eye^{15,16}. In this study, an RT-LAMP molecular assay for YFV diagnostics in NHP tissues was developed and validated. This diagnostic pipeline aids in early virus detection, especially in areas experiencing outbreaks. It enables decentralized testing, allowing for rapid implementation of preventive measures¹¹.

Materials and methods

Collection of NHP tissue samples

The biological samples analyzed in this study were obtained from NHP epizootics events in municipalities within the Southern region of Santa Catarina State (Southern Brazil). The specimens were collected by the Santa Catarina State Epidemiological Surveillance Service (Fig. 1). The state government collected tissue fragments from NHP carcasses, stored them in cryotubes, froze them, and transported them to the Central Public Health Laboratory (LACEN/SC), and subsequently to the FIOCRUZ reference laboratory (Carlos Chagas Institute, PR—Brazil) for official YFV molecular diagnosis by RT-qPCR technique. Simultaneously, approximately 0.5 cm² pieces of tissue were collected for this study, preserved in RNAlater stabilization solution (Invitrogen—Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and stored at −20 °C until the moment of viral RNA extraction. A total of 12 NHP epizootics, sampled between March 2021 and February 2022, were processed and analyzed. In each collection, tissues from five types were obtained: spleen, heart, liver, lung, and kidney, resulting in a total of 60 tissues analyzed. Epidemiological data for each NHP sample are detailed in Table 1.

Primer design for YFV

Around 50 complete YFV genomes from GenBank were analyzed to identify conserved genomic regions for primer design. These genomes, obtained from Brazilian isolates (Table S1), identified from 2000 to 2021, were realigned using the Clustal Omega multiple sequence alignment tool (<https://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo>). Following the identification of regions with the highest homology among all strains, based on the NS5 and E

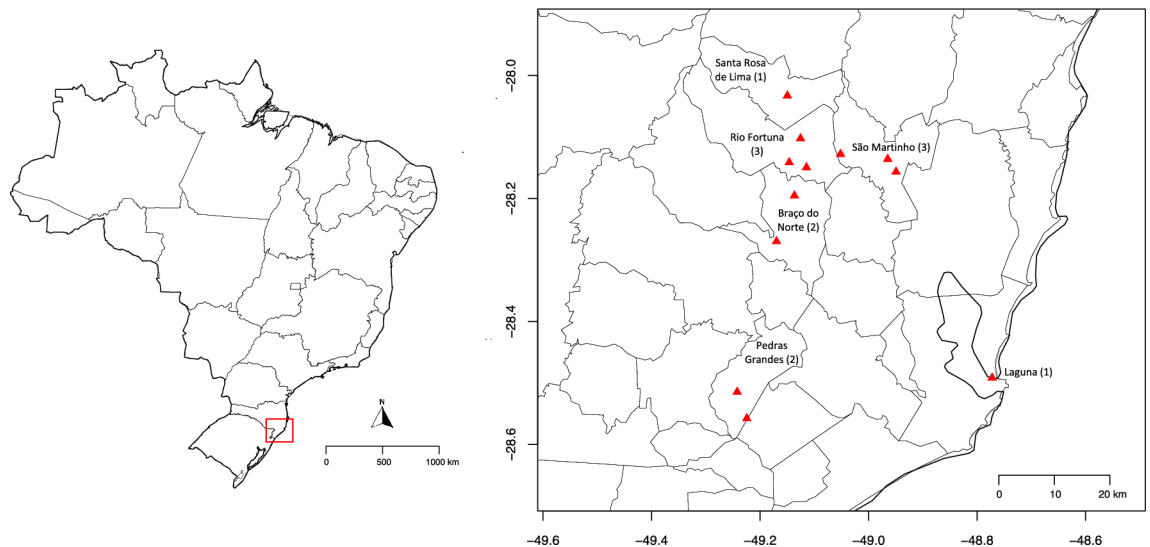


Fig. 1. Collection sites for non-human primate (NHP) tissues in municipalities from the Southern region of Santa Catarina State, Brazil. The left side features a map of Brazil, while the right side provides a magnified view of the red box from the Brazil map, indicating the specific sample collection sites (red triangles). The x and y axes on the right map represent longitude and latitude, respectively. The number of collections from each municipality is shown in parentheses. The maps were generated using the *sf*, *maps*, and *mapdata* packages^{17–20} from R Software, version 4.3.1²¹.

Municipality	Sample identification	Collection date	SINAN number	Host	Sample type	RT-qPCR Result
Rio Fortuna	1	03/03/2021	4563807	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	2				Heart	Detectable
	3				Liver	Detectable
	4				Lung	Detectable
	5				Kidney	Detectable
Santa Rosa de Lima	6	05/03/2021	1414470	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	7				Heart	Detectable
	8				Liver	Detectable
	9				Lung	Detectable
	10				Kidney	Detectable
Braço do Norte	11	06/03/2021	5069209	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	12				Heart	Detectable
	13				Liver	Detectable
	14				Lung	Detectable
	15				Kidney	Detectable
Rio Fortuna	16	08/03/2021	4563814	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	17				Heart	Detectable
	18				Liver	Detectable
	19				Lung	Detectable
	20				Kidney	Detectable
São Martinho	21	13/03/2021	4606986	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	22				Heart	Detectable
	23				Liver	Detectable
	24				Lung	Detectable
	25				Kidney	Detectable
Rio Fortuna	26	16/03/2021	4563818	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	27				Heart	Detectable
	28				Liver	Detectable
	29				Lung	Detectable
	30				Kidney	Detectable
São Martinho	31	17/03/2021	4606990	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	32				Heart	Detectable
	33				Liver	Detectable
	34				Lung	Detectable
	35				Kidney	Detectable
São Martinho	36	06/04/2021	5175026	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	37				Heart	Detectable
	38				Liver	Detectable
	39				Lung	Detectable
	40				Kidney	Detectable
Pedras Grandes	41	23/11/2021	3229070	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	42				Heart	Detectable
	43				Liver	Detectable
	44				Lung	Detectable
	45				Kidney	Detectable
Pedras Grandes	46	24/11/2021	3229071	<i>Allouatta genus</i>	Spleen	Detectable
	47				Heart	Detectable
	48				Liver	Detectable
	49				Lung	Detectable
	50				Kidney	Detectable
Braço do Norte	51	31/03/2021	5069214	<i>Callithrix genus</i>	Spleen	Not detectable
	52				Heart	Not detectable
	53				Liver	Not detectable
	54				Lung	Not detectable
	55				Kidney	Not detectable
Continued						

Municipality	Sample identification	Collection date	SINAN number	Host	Sample type	RT-qPCR Result
Laguna	56	19/02/2022	8285928	<i>Cepajus genus</i>	Spleen	Not detectable
	57				Heart	Not detectable
	58				Liver	Not detectable
	59				Lung	Not detectable
	60				Kidney	Not detectable

Table 1. Epidemiological data summary for non-human primate (NHP) samples. Municipality: location where the sample was collected. Sample identification: a unique code (1–60) was assigned to each tissue sample obtained from 12 NHP collections, with a total of 60 tissues analyzed. Collection date: date of sample collection. SINAN number: identification number in the National Notifiable Diseases Information System. Host: species of the host. Sample type: tissues from five types (spleen, heart, liver, lung, and kidney) obtained in each of the 12 collections. RT-qPCR: results of the RT-qPCR test from the FIOCRUZ reference laboratory (Carlos Chagas Institute, PR-Brazil).

gene sequences, a single consensus sequence was generated to design degenerated primers for these genes using the NEB LAMP Primer Design Tool v1.4.1 (available at <https://lamp.neb.com>).

The designed primer sets contained: forward primer (F3), backward primer (B3), forward inner primer (FIP), and backward inner primer (BIP) (Fig. S1). A TTTT linker sequence was included between the two components of FIP (F1c/F2) and BIP (B1c/B2), as this has been reported to improve the reaction by increasing hybridization sensitivity²². The YFV designed primers were compared with the available NS5 and E genes *Flavivirus* sequences (from DENV and ZIKV) to avoid cross-reaction.

Viral RNA extraction

Viral RNA was extracted from NHP tissue fragments weighing between 10 and 30 mg each. The samples were placed in Eppendorf tubes with 600 μ L of lysis solution—Monarch Total RNA MiniPrep kit (New England BioLabs). After maceration for homogeneity, RNA extraction was performed following the manufacturer's instructions. The RNA was eluted in 50 μ L of nuclease-free water and stored at -80°C . RNA quantification was performed using the Qubit RNA BR Assay Kit (Q10210) and Qubit 4 fluorometer Invitrogen (Thermo Fischer Scientific).

RT-LAMP reaction

The RT-LAMP assay used three primer sets targeting NS1 (described by Nunes et al.¹³), NS5, and E genes specifically designed in this study (Table 2). All primers were resuspended in nuclease-free water and combined to make a $10\times$ primer mix as follows for each set: FIP and BIP (16 μ M each), F3 and B3 (2 μ M each), LF and LB (4 μ M each). The RT-LAMP reaction contained 12.5 of 2X WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix (New England BioLabs, Protocol M1800), 2.5 μ L from each of the $10\times$ primer mixes, 4 μ L of target RNA, and RNase-free water totaling 25 μ L. The reactions were carried out in 0.2 mL microtubes and incubated in a dry bath (Kasvi) at 65°C for 40 min. Results were visually interpreted, with pink indicating negative and yellow indicating positive results, and recorded using a smartphone camera.

Analytical specificity of RT-LAMP assays

To evaluate the specificity of the RT-LAMP assay for YFV detection, different flaviviruses RNA were tested, including Dengue (DENV-1: DV1 BR90; DENV-2: ICC 265; DENV-3: DV3 BR98; DENV-4: TVT 360) and Zika viruses (ZIKV: BR 2015/15261). Tests were performed in ten independent replicates per protocol, in addition to positive control containing YFV RNA (vaccine strain 17D), and negative controls using nuclease-free water instead of RNA.

Furthermore, RT-LAMP assays were conducted to detect YFV in samples containing other flaviviruses. Different pools of RNA were tested, one set containing RNA from DENV1-4, ZIKV, and YFV, and another set containing RNA from DENV1-4 and ZIKV, but excluding YFV. These RT-LAMP assays were performed in independent triplicates.

Analytical sensitivity of RT-LAMP assays

To evaluate the sensitivity (detection limit) of the RT-LAMP assay for YFV, a ten-fold dilution series of RNA extracted from the supernatant of YFV-infected Vero cells (strain ES-504) was used, with titers ranging from 1.2×10^6 to 1.2×10^{-3} PFU/mL. After dilution, the samples were tested directly in RT-LAMP, with a negative control included. The assays were conducted in five separate runs and analyzed using probit regression with MedCalc Statistical Software version 19.2.6 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; www.medcalc.org; 2020).

Evaluation and validation of RT-LAMP assays with NHP tissue samples

To validate RT-LAMP for diagnosing YFV in NHP tissues, 60 viscera samples were tested (Table 1). All RT-LAMP assays with NHP tissue samples were performed in triplicates. The same assays were also repeated using the endogenous control β -actin from vertebrates as described by Zhang et al.²³, with some modifications. Each RT-LAMP assay included a negative control (using nuclease-free water instead of RNA) and a positive control containing YFV RNA (vaccine strain 17D). We compared our RT-LAMP results with RT-qPCR assays official

Target		Primers Sequence (5' → 3')
NS1*	F3	TCCACACCYTGGAGRCAYTR
	B3	GYCCATCACAGYGGCCRTCA
	FIP	GRCTCCGATTGAYCTCGGCTTARTGTGARTGGCCRCCTGAC
	BIP	GGTYCAGACRAACGGACCTGGTTYCTGGCAAGCTTCTCT
	LF	CTTCAACTGATGTCCAATCGTATG
	LB	ATGCAGGTRCCACTAGAAGTGA
NS5	F3	GAACAGTGGAAAGACTGCCAA
	B3	CAGCCACATGTACCAGATGG
	FIP	GCTGATGCARCCGTCGTTCTCTTTTGAAGCTGTCCAAGATCCGA
	BIP	GGCAGGTGCCGRACCTGTGTTTTTCGCCTTCCAAACTCTGACA
E	F3	TTYATTGAGGGGGTGCATGG
	B3	CAAGTGGGCTTACCAGTG
	FIP	GTCYAGTGAAGGCTTGTCRGGTTTTTGGGTTTCAGCCACYTTG
	BIP	TGCCATTGATGGACCYGCTGARTTTTGGGGCACTTGTGATGATCT
ACTB*	F3	AGTACCCCATCGAGCAGC
	B3	AGCCTGGATAGCAACGTACA
	FIP	GAGCCACACGCAGCTCATTGTATCACCAACTGGGACGACA
	BIP	CTGAACCCCAAGGCCAACCGGCTGGGGTGTGAAGGTC
	LF	TGTGGTGCCAGATTTCTCCA
	LB	CGAGAAGATGACCCAGATCATGT

Table 2. Sequences of primers used in RT-LAMP assays. FIP (F1c + F2); BIP (B1 + B2c, Fig. S1). *Primer NS1 designed by Nunes et al.¹³ *ACTB Primer designed by Zhang et al.²³.

results from the national health authority performed at ICC/FIOCRUZ reference laboratory (Carlos Chagas Institute, PR-Brazil) to assess accuracy, sensitivity, and specificity (unpublished data).

Results

Assessment of RT-LAMP primer for YFV with NHP tissues

Each primer set (Table 2) was individually tested with NHP tissue samples. The NS5 and E primers, specifically designed for YFV detection in Brazil, effectively identified the virus in the samples. Despite Nunes et al.¹³ primer targeting the NS1 gene failing to amplify the recent Southern Brazilian circulating YFV strains, it successfully amplified the YFV vaccine strain 17D used as a positive control. Thus, we chose to keep this primer in the protocol due to its ability to amplify strains from other regions of the world. Next, the combination of all three sets of primers (NS5, E, and NS1) was tested in a single RT-LAMP reaction. The assay time was optimized to 40 min, compared to the 50 min required when each set of primers was evaluated individually. The RT-LAMP results matched the RT-qPCR assays conducted by the national health authorities at FIOCRUZ in the analysis of 60 different tissues from 12 NHP epizootics events. Out of the 60 NHP samples tested with RT-qPCR, 10 were negative, and the remaining 50 were positive (Table 1), consistent with the RT-LAMP assay results conducted with three replicates of each tissue sample (Fig. 2), showing 100% sensitivity, specificity, and accuracy. Each code in Table 1 (Sample identification 1–60) corresponds to the tests presented in Fig. 2. All 60 samples tested positive with the RT-LAMP assay targeting the vertebrate endogenous control β -actin (Fig. S2).

Analytical specificity and sensitivity assessment of RT-LAMP assays

The RT-LAMP assay for YFV detection showed no cross-reaction with other viruses from the *Flavivirus* genus (DENV1-4 and ZIKV). The results were negative across all ten replicates of the analyzed viruses (Fig. 3). Additionally, an RT-LAMP assay was conducted to detect YFV in samples containing other flaviviruses, testing pools including RNA from DENV1-4, ZIKV, and YFV, and pools with the same set of viruses, but excluding YFV. Positive results were only observed in experiments involving pools containing YFV. Conversely, samples from pools without YFV yielded negative results across all three replicates (Fig. S3). Notably, no amplification was detected in negative controls containing water, whereas positive controls containing YFV RNA consistently exhibited amplification.

Serial dilutions of YFV (strain ES-504) were used to test the sensitivity (limit of detection) of the RT-LAMP assay for diagnosing YFV. A concentration of 1.2×10^1 PFU/mL demonstrated 100% positive performance (Fig. 4a), while the probit regression analysis resulted in a limit of detection (within 95% reliability) of 2.4 PFU/mL ($p < 0.0001$) (Fig. 4b). When considering the orange results as positive (Fig. 4a), the limit of detection of the assay was 1, 2×10^{-1} PFU/mL, and the probit regression analysis resulted in a limit of detection (within 95% reliability) of 5×10^{-1} ($p < 0.0001$) (Fig. 4c).

Discussion

Labor-intensive techniques (e.g.: RT-qPCR) impede early detection of YFV in NHP, humans, and mosquitoes, delaying the implementation of YF surveillance programs due to the need for specialized equipment and skilled



Fig. 2. YFV detection in NHP tissue samples using RT-LAMP with three primers set (NS5, E, and NS1). Amplification products were visually inspected, with pink indicating negative and yellow indicating positive results. 1–50: positive results, 51–60: negative results, NC: negative control using nuclease-free water instead of RNA, PC: positive control with YFV RNA (vaccine strain 17D). Each code in Table 1 (sample identification 1–60) corresponds to the tests presented in this figure.

technicians²⁴. In this study, RT-LAMP assays using three primers targeting different molecular regions (NS1, NS5, and E) streamline YFV detection, reducing processing time compared to RT-qPCR, and overcoming limitations in early YFV detection through both molecular and serological methods^{25,26}.

Initial experiments revealed that the NS1 primer for YFV¹³ failed to amplify South American strains (Accession numbers: OP508651.1, OP508679.1, OP508678.1, OP508680.1, OP508683.1, OP508684.1, OP508652.1) from a recent outbreak in Southern Brazil (2019–2021). This failure was due to genetic polymorphisms at the primer binding site, as it was originally designed based on older strains from Bolivia, Colombia, Ecuador, French Guiana, Panama, Peru, Trinidad, Venezuela, the vaccine strain, and Brazil that circulated between 1980 and 2002¹³. Indeed, Meagher et al.²⁷ noted that the NS1 region is not completely conserved in all YFV lineages. To tackle this, in this study new degenerate primers targeting conserved NS5 and E regions of the YFV genome were designed to broaden coverage across multiple virus strains, enhancing test robustness and sensitivity²⁷. These, alongside the NS1 primer¹³, were employed in RT-LAMP reactions for specific YFV RNA detection. Therefore, it is recommended to periodically review the YFV diagnostic primers used in both RT-qPCR or RT-LAMP assays to identify mutations and reduce the risk of false negatives. In addition to accounting for polymorphisms at the primer binding site, it is essential to thoroughly assess the risk of primer dimerization during the primer design process²⁸, as this can lead to nonspecific amplification and result in false positives²⁹. To mitigate this, primers were designed to avoid complementarity, using the NEB LAMP Primer Design Tool v1.4.1. Primers with the lowest probability of dimerization were selected, and the reaction conditions—including temperature, time, and reagent concentrations—were optimized. Control samples were also used to ensure the accuracy of the tests. Even with these control measures in place, LAMP remains highly effective for diagnostics. It can detect pathogens at very low concentrations, which is essential for managing and controlling rapidly spreading infections³⁰.

Several molecular diagnostic protocols for YFV have been proposed^{13,24–26,31}, yet none have been evaluated using field-collected samples from NHP tissues. Despite Nunes et al.²⁶ findings, which demonstrated higher sensitivity in detecting YFV in experimentally infected hamster liver samples (by PCR and RT-qPCR techniques), the RT-LAMP assay showed potential in detecting YFV across all NHP samples, even in tissues such as lung, heart, and kidney, which are commonly known to have low YFV viral loads².

The limit of detection identified in this study is found to be equivalent to 12 PFU/mL (Fig. 4a–b), a result like that demonstrated by Nunes et al.¹³ of 19 PFU/mL using RT-LAMP, and equivalent to those observed using RT-qPCR (9 PFU/mL)²⁶. Following Astari et al.³² findings, which interpret orange results as indicative of amplification, the assay's detection limit might be even lower than 12 PFU/mL (Fig. 4c). Also, our study found no cross-reaction with other arboviruses, including DENV1-4 and ZIKV, indicating the specificity of the RT-LAMP assay for YFV detection, mitigating a common potential limitation of *Flavivirus* diagnostic³³. Even when other flaviviruses were present in a pooled experiment (DENV1-4 + ZIKV + YFV), the RT-LAMP assay showed high sensitivity, with no interference in YFV detection. Additionally, in the absence of YFV in a flavivirus pool, no amplification occurred, confirming the specificity of the primers designed for YFV detection.

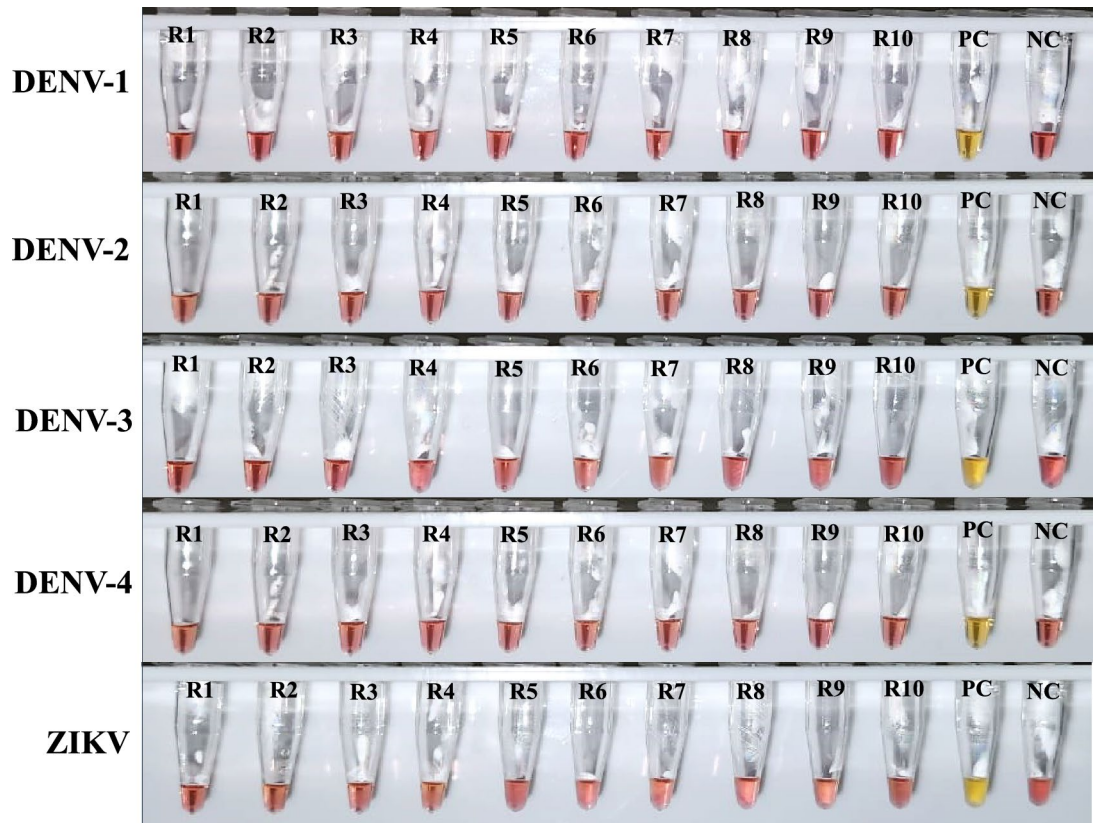


Fig. 3. RT-LAMP specificity test assay for YFV detection. The RNA of other flaviviruses circulating in Brazil were tested, including Dengue (DENV-1: DV1 BR90; DENV-2: ICC 265; DENV-3: DV3 BR98; DENV-4: DVT 360) and Zika viruses (ZIKV: BR 2015/15,261). R1–R10: ten independent replicates containing *Flavivirus* RNA, PC: positive control containing YFV RNA (vaccine strain 17D), NC: negative control using nuclease-free water instead of RNA. Amplification products were visually inspected, with pink indicating negative and yellow indicating positive results.

The LAMP technique shows great potential for diagnosing pathogens in remote areas because it is easy to use. Several studies have already standardized LAMP assays for direct analysis without the need for DNA/RNA extraction^{33–35}. Additionally, the lyophilization of LAMP reagents has been validated, allowing them to be stored at room temperature for extended periods^{34,36}, which makes the method suitable for use in areas without refrigeration^{34,37}. Although our study did not investigate RNA extraction alternatives due to the rarity of the NHP samples, or used lyophilized reagents, its aim was to validate a technique that can be used outside of reference laboratories. This approach could accelerate YFV diagnostics and potentially reduce the risk of disease spread to humans. Given the presence of many other arboviruses in resource-limited settings, this technique is crucial for effective monitoring in remote areas. RT-LAMP reactions are already standardized for detecting several arboviruses, including Zika and Dengue^{38,39}. Although standardizing a multiplex LAMP reaction can be challenging due to potential issues such as primer dimerization, some studies have successfully demonstrated the feasibility of using multiplex LAMP assays to identify multiple pathogens in a single test^{28,40}.

The RT-LAMP assay developed for NHPs is expected to detect YFV in humans and mosquitoes, as the primers were designed based on prevalent strains in these groups. It exhibits 100% specificity and sensitivity (Fig. 2, Table 1), comparable to the RT-qPCR technique²⁶, making it a reliable, cost-effective, and user-friendly alternative for YFV molecular diagnosis. It addresses critical gaps present in other protocols^{25,26}, offering easily interpretable results without sophisticated equipment. Our goal is to improve surveillance of NHP epizootics, humans, and mosquitoes, to enable a prompt response to prevent human YFV outbreaks.

Conclusion

Early detection of Yellow Fever in the NHP can assist in the prevention of human epidemics. However, the current diagnostic method (RT-qPCR) is costly, time-consuming, and requires trained personnel, making it impractical for monitoring. New diagnostic technologies should be fast, cheap, sensitive, and usable in decentralized settings. In this study, an RT-LAMP assay for YFV diagnosis was developed with a 40-min incubation time, requiring no trained technicians or expensive equipment. The results are visible to the naked eye, reducing process time. The assay showed 100% specificity and sensitivity, proving robust and reliable for YF diagnosis.

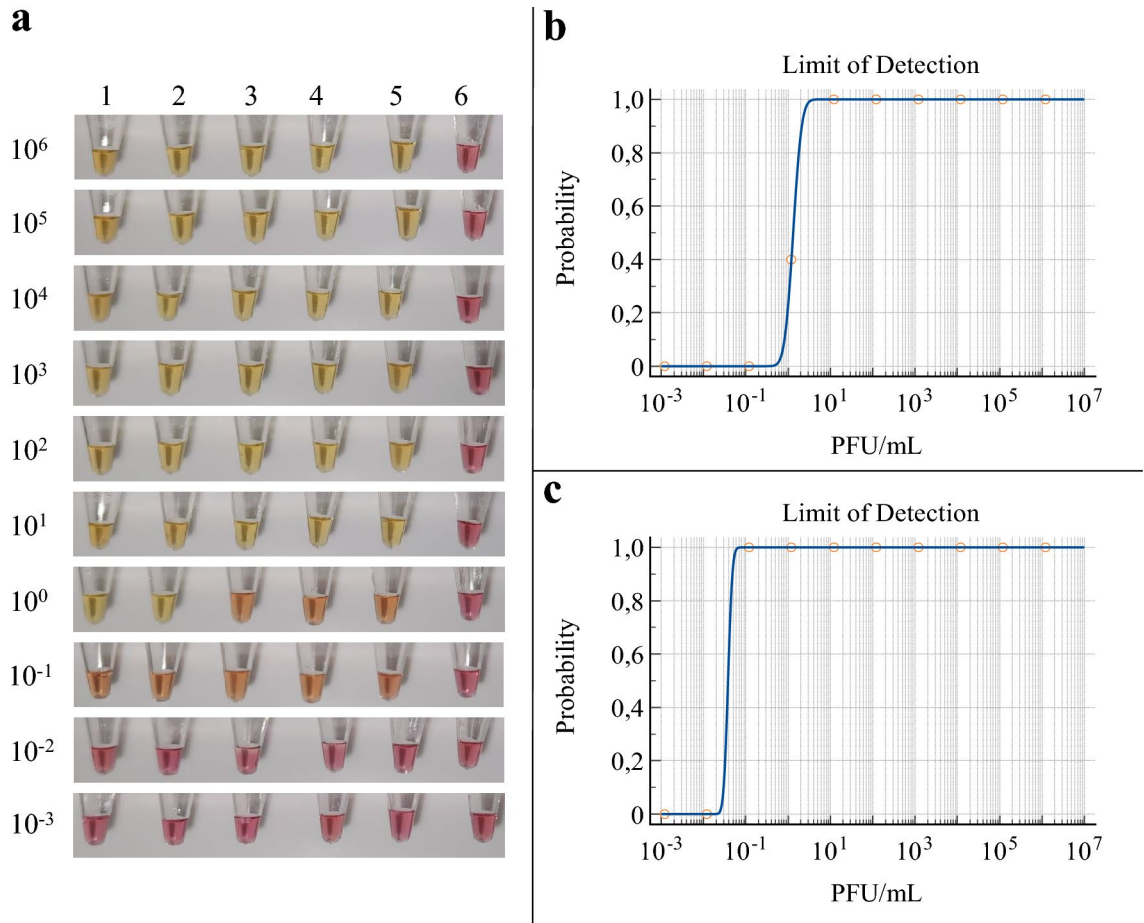


Fig. 4. Sensitivity of YFV RT-LAMP assay. **(a)** Assay colorimetric results of five replicates (1–5) and a negative control with water (6) tested with a serial dilution of YFV RNA (10^6 – 10^{-3} PFU/mL). **(b)** Limit of detection of 10^1 PFU/mL established through the probit regression analysis and considering only yellow results as positive. **(c)** Limit of detection of 10^{-1} PFU/mL established through the probit regression analysis and considering yellow and orange results as positive.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 2 July 2024; Accepted: 23 September 2024

Published online: 28 September 2024

References

- McArthur, D. B. Emerging infectious diseases. *Nurs. Clin. North. Am.* **54**, 297–311 (2019).
- Vasconcelos, P. F. C. Febre amarela [yellow fever]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**, 275–293 (2003).
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. & Rossmann, M. G. A. Structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 13–22 (2005).
- Domingo, C., Patel, P., Linke, S., Achazi, K. & Niedrig, M. Molecular diagnosis of flaviviruses. *Future Virol.* **6**, 1059–1074 (2011).
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649–688 (1990).
- Silva, N. I. O. *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Viol. J.* **17**, 9–20 (2020).
- Mir, D. *et al.* Phylodynamics of yellow fever virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci. Rep.* **7**, 7385 (2017).
- Giovanetti, M. *et al.* Genomic epidemiology unveils the dynamics and spatial corridor behind the yellow fever virus outbreak in Southern Brazil. *Sci. Adv.* **9**, eadg9204 (2023).
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia de Vigilância de Epizootias em Primatas não Humanos e Entomologia Aplicada à Vigilância da Febre Amarela. Brasília, v2, (2014).
- Moreno, E. S. *et al.* Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008–2009. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **55**, 45–50 (2013).
- Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Febre amarela: guia para profissionais de saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 67 (2017).
- Diego, J. G. B. *et al.* A simple, affordable, rapid, stabilized, colorimetric, versatile RT-LAMP assay to detect SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)* **11**, 438 (2021).

13. Nunes, M. R. T. *et al.* Analysis of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for yellow fever diagnostic. *J. Virol. Methods* **226**, 40–51 (2015).
14. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63 (2000).
15. Mori, Y. & Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* **15**, 62–69 (2009).
16. Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* **16**, 223–229 (2002).
17. Pebesma, E. & Bivand, R. *Spatial data science: With applications* 1st edn. (R. Chapman and Hall, Boca Raton, 2023).
18. Pebesma, E. Simple features for R: Standardized support for spatial vector data. *R J.* **10**, 439–446 (2018).
19. Becker, R.A., Wilks, A. R., Minka, T.P., Deckmyn, A. maps: Draw Geographical Maps. R package version 3.4.2. (2023).
20. Becker, R.A., Wilks, A. R., Brownrigg, R. mapdata: Extra Map Databases. R package version 2.3.1. (2022).
21. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing (2014).
22. Torres, C. *et al.* LAVA: An open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinform.* **12**, 240 (2011).
23. Zhang, Y. *et al.* Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *Biotechniques* **69**, 178–185 (2020).
24. Domingo, C. *et al.* Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 4054–4060 (2012).
25. Domingo, C. *et al.* First international external quality assessment study on molecular and serological methods for yellow fever diagnosis. *PLoS One* **7**, e36291 (2012).
26. Nunes, M. R. *et al.* Evaluation of two molecular methods for the detection of yellow fever virus genome. *J. Virol. Methods* **174**, 29–34 (2011).
27. Meagher, R. J., Priye, A., Light, Y. K., Huang, C. & Wang, E. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. *Analyst* **116**(143), 1924–1933 (2018).
28. Das, D., Lin, C. W. & Chuang, H.-S. LAMP-based point-of-care biosensors for rapid pathogen detection. *Biosensors* **12**, 1068 (2022).
29. Kim, S. H., Lee, S. Y., Kim, U. & Oh, S. W. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: a review. *Anal. Chim. Acta* **1280**, 341693 (2023).
30. Yang, S. & Rothman, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 337–348 (2004).
31. Kwallah, A. O. *et al.* A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J. Virol. Methods* **193**, 23–27 (2013).
32. Astari, D. E. *et al.* Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with novel quantitative pH biosensor readout method for SARS-CoV-2 detection. *APMIS* **132**, 499–506 (2024).
33. Silva, S. *et al.* Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. *Sci. Rep.* **9**, 4494 (2019).
34. Hayashida, K. *et al.* (2019) Field diagnosis and genotyping of chikungunya virus using a dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and MinION sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007480 (2019).
35. Rivas-Macho, A., Sorarrain, A., Marimón, J. M., Goñi-de-Cerio, F. & Olabarria, G. Extraction-free colorimetric RT-LAMP detection of SARS-CoV-2 in saliva. *Diagnostics (Basel)* **13**, 2344 (2023).
36. Prado, N. O. *et al.* Development and evaluation of a lyophilization protocol for colorimetric RT-LAMP diagnostic assay for COVID-19. *Sci. Rep.* **14**, 10612 (2024).
37. Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S. & Chee, H. Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **3**, 626–643 (2018).
38. Lopez-Jimena, B. *et al.* Desenvolvimento e validação de ensaios RT-LAMP em tempo real para a detecção específica do vírus Zika. *Métodos Mol. Biol.* **2142**, 147–164 (2020).
39. Lopez-Jimena, B. *et al.* Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006381 (2018).
40. Jiang, Y. *et al.* Multiplex loop-mediated isothermal amplification-based lateral flow dipstick for simultaneous detection of 3 food-borne pathogens in powdered infant formula. *J. Dairy Sci.* **103**, 4002–4012 (2020).

Acknowledgements

The authors would like to thank the Directorate of Epidemiological Surveillance of the State of Santa Catarina (DIVE/SC), Brazil, for collecting the NHP tissue samples, and LACEN/SC for sharing the RT-qPCR official results. This paper is part of the Ph.D. thesis of Sabrina Fernandes Cardoso from the Graduation Program of Cell and Developmental Biology (PPGBCD) at the Biological Sciences Center (CCB) at the Federal University of Santa Catarina (UFSC).

Author contributions

S.F.C. drafted the manuscript and collected the NHP tissue samples; S.F.C., A.N.P., A.A.G.Y., I.C.P., and L.D.R.P. participated in data generation and analysis; A.A.G.Y. helped with primer design, experimental design, and molecular analysis; L.W.G., D.C.L., M.S.A.S.N., and D.S.M. helped with all project logistics and molecular analyzes; A.N.P. and L.D.P.R. helped in the paper drafting by critically reading the original manuscript; A.N.P. and L.D.P.R. were the principal investigators, participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The study was funded by IOC—FIOCRUZ, National Council for Scientific and Technological Development MCTI/CNPq/CAPES/FAPs no 16/2014, Wellcome Trust, 207486/Z/17/Z.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74020-4>.

[org/10.1038/s41598-024-74020-4](https://doi.org/10.1038/s41598-024-74020-4).

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.N.P. or L.D.P.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2024

3.1.1 Material Suplementar do Capítulo I

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1. YFV strains used for aligning RNA sequences and designing RT-LAMP primers for YFV diagnosis, specifically targeting the NS5 and E regions.

Target	Genbank accession numbers	Host	Country	Year of collection
NSS/Protein E	JF912187.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2000
NSS/Protein E	JF912188.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2000
NSS/Protein E	JF912189.1	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	Brazil	2001
NSS/Protein E	MG969501.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2001
NSS/Protein E	KY861728.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2008
NSS/Protein E	MW034590.1	<i>Alouatta caraya</i>	Brazil	2016
NSS/Protein E	MK333802.1	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	OP508715.1	non-human primate	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370545.1	<i>Aotus ozzarae infulatus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370542.1	<i>Alouatta guariba</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370539.1	<i>Sapajus libidinosus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370543.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370541.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2017
NSS/Protein E	MN506273.1	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370546.1	<i>Alouatta caraya</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370544.1	<i>Aotus ozzarae infulatus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370545.1	<i>Aotus ozzarae infulatus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF370539.1	<i>Sapajus libidinosus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF423373.2	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	KY885000.2	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	KY885001.2	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MF465805.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2017
NSS/Protein E	MK583154.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MN643077.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK583157.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MW308134.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK583158.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK583179.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK583155.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK583156.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MZ604840.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK583182.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK760664.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MK333809.1	<i>Haemagogus janthinomys</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MN506291.1	<i>Haemagogus janthinomys</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MN643092.1	<i>Alouatta guariba</i>	Brazil	2018
NSS/Protein E	MW308135.1	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	2019
NSS/Protein E	MK533792.1	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Brazil	2019
NSS/Protein E	OP508682.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2019
NSS/Protein E	OP508592.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2019
NSS/Protein E	OP508599.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2019
NSS/Protein E	OP508675.1	<i>emagogus janthinomys/capricor.</i>	Brazil	2019
NSS/Protein E	OP508681.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2020
NSS/Protein E	OP508696.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2020
NSS/Protein E	OP508651.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2020
NSS/Protein E	OP508679.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2021
NSS/Protein E	OP508678.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2021
NSS/Protein E	OP508680.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2021
NSS/Protein E	OP508683.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2021
NSS/Protein E	OP508684.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2021
NSS/Protein E	OP508652.1	<i>Alouatta</i> sp.	Brazil	2021

Figure S1. LAMP primers design for detection of yellow fever virus.

a - NS5 region of the Yellow Fever Virus (YFV) genome, strain PR6021-2017 (GenBank accession number OP508715.1). b - Region E of the YFV genome, strain PR5952-BeAn84540 (GenBank accession number MF370545.1).

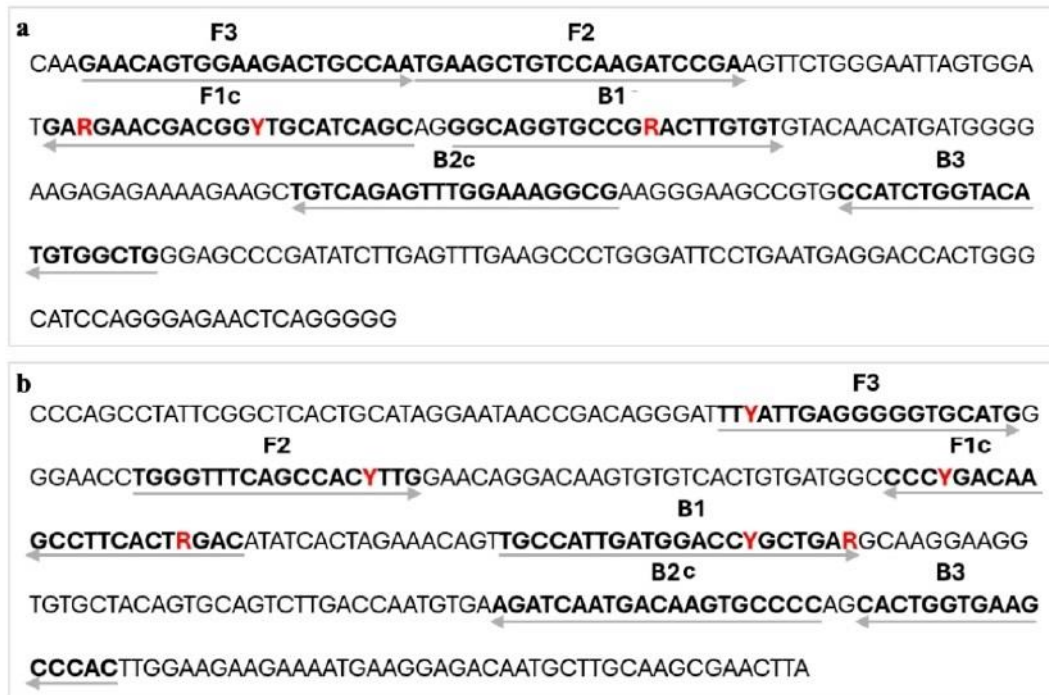


Figure S2. RT-LAMP assay targeting the vertebrate endogenous control β -actin. Amplification products were visually inspected, with pink indicating negative and yellow indicating positive results. NC: negative control using nuclease-free water instead of RNA, PC: positive control with NHP RNA. Each code in Table 1 (Sample identification 1 to 60) corresponds to the tests presented in this figure.

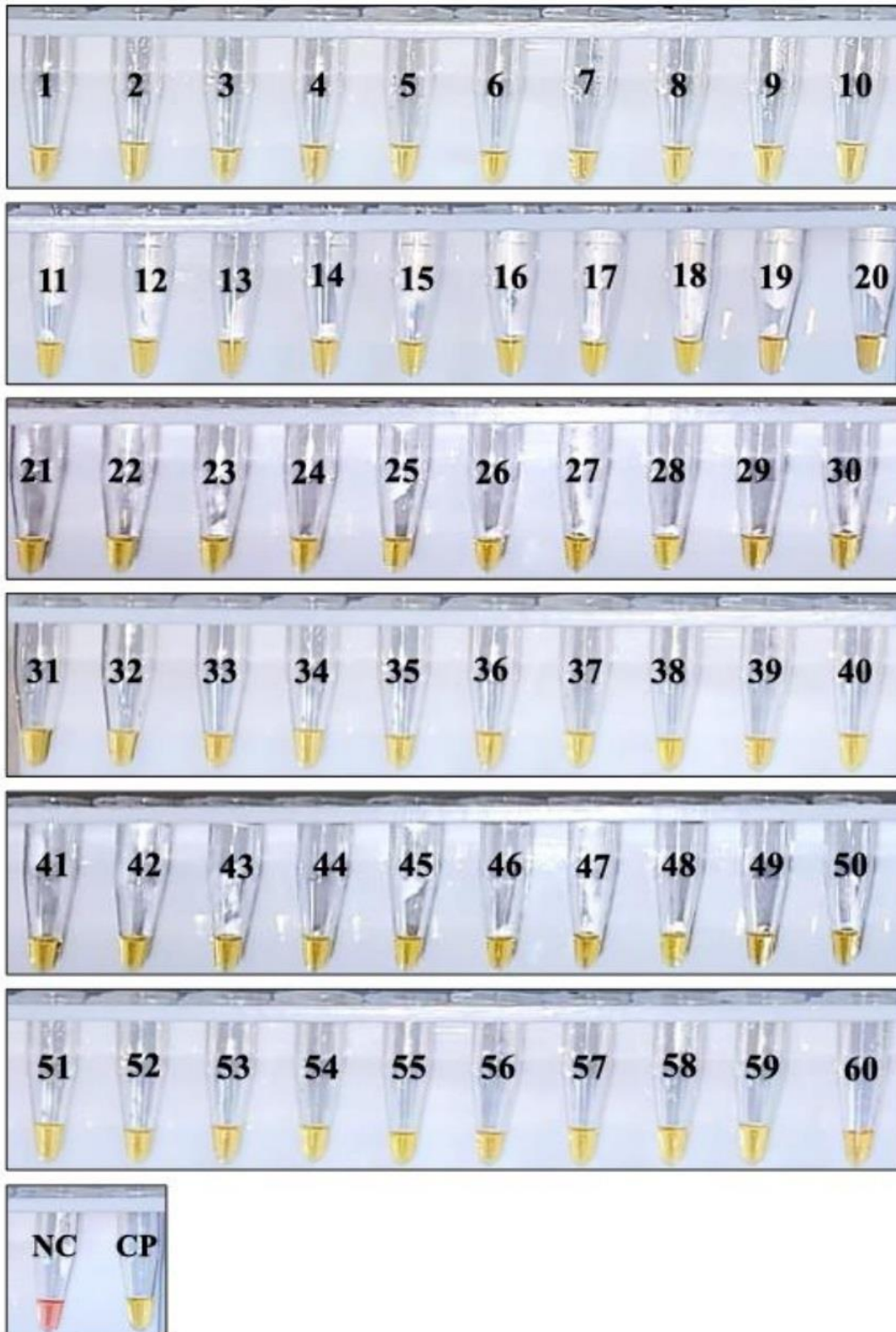
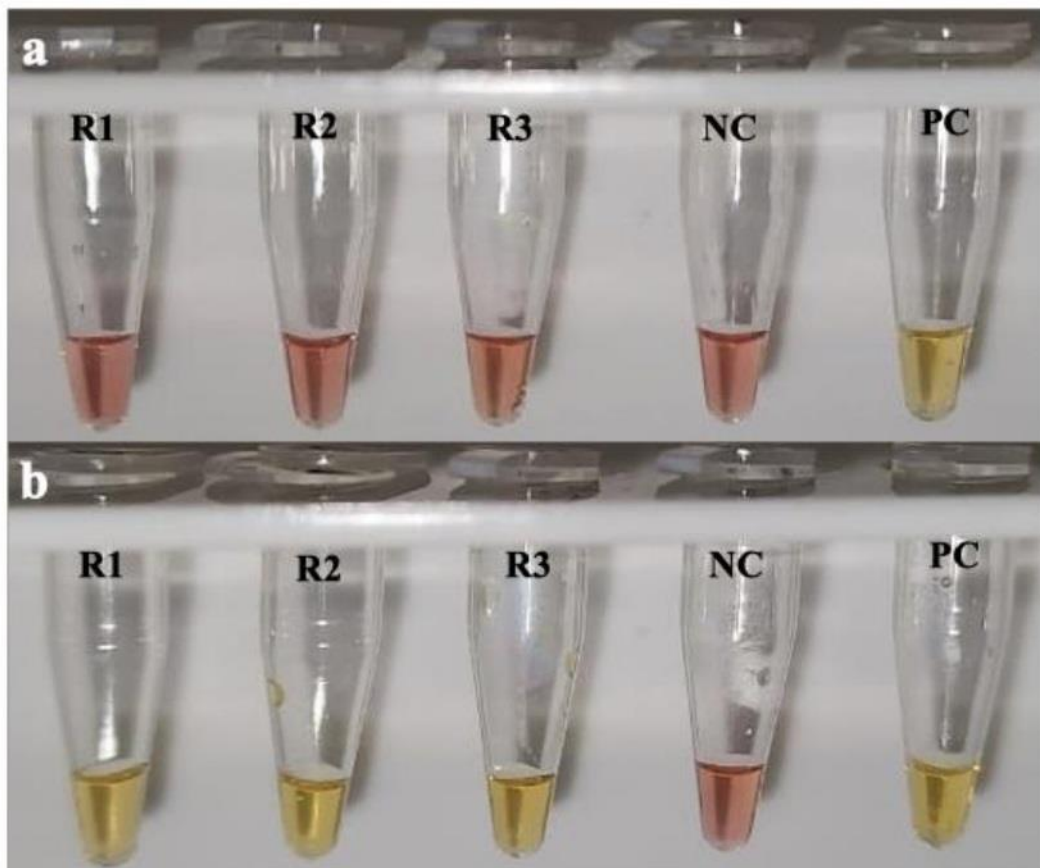


Figure S3. Specificity of YFV RT-LAMP. a - R1 – R3: RT-LAMP assays conducted with Dengue (DENV-1: DV1 BR90; DENV-2: ICC 265; DENV-3: DV3 BR98; DENV-4: DVT 360) and Zika viruses (ZIKV: BR 2015/15261), without the presence of YFV, in three independent replicates; NC: negative control using nuclease-free water instead of RNA, PC: positive control containing YFV RNA (vaccine strain 17D). b - R1 – R3: RT-LAMP assays were conducted to identify YFV in the presence of Dengue (DENV-1: DV1 BR90; DENV-2: ICC 265; DENV-3: DV3 BR98; DENV4 : DVT 360), Zika (ZIKV: BR 2015/15261), and YFV (vaccine strain 17D), in three independent replicates; NC: negative control using nuclease-free water instead of RNA, PC: positive control containing YFV RNA (vaccine strain 17D). Amplification products were visually inspected, with pink indicating negative and yellow indicating positive results.



3.2 CAPÍTULO II – EXPANDED RANGE OF *HAEMAGOGUS LEUCOCELAENUS* IN YELLOW FEVER HOTSPOTS: NEW FINDINGS FROM SANTA CATARINA STATE, SOUTHERN BRAZIL.

Artigo científico: Expanded range of *Haemagogus leucocelaenus* in yellow fever hotspots: new findings from Santa Catarina State, southern Brazil.

Referência Bibliográfica: Cardoso SF, Pinheiro IC, Kikuti LAO, Yoshikawa AAG, Pitaluga AN, Rona LDP. Expanded range of *Haemagogus leucocelaenus* in yellow fever hotspots: new findings from Santa Catarina State, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2025 Jul 4;120:e240240. doi: 10.1590/0074-02760240240.

Situação do manuscrito: Publicado na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

No Brasil, a febre amarela é transmitida por meio de dois ciclos epidemiológicos distintos: o ciclo silvestre, que envolve PNH e mosquitos vetores silvestres, principalmente dos gêneros *Sabethes* e *Haemagogus*; e o ciclo urbano, não registrado no país desde 1942, no qual o YFV é transmitido ao ser humano por meio do mosquito *Ae. aegypti*. O segundo capítulo desta tese trata da distribuição geográfica de *Hg. leucocelaenus*, um dos principais vetores do YFV, na região Sul do estado de SC, a qual foi afetada por um surto de febre amarela silvestre no ano de 2021. Adicionalmente, o capítulo aborda aspectos morfológicos e moleculares da espécie, apresentando as primeiras sequências de DNA barcode provenientes da região Sul do Brasil.

Expanded range of *Haemagogus leucocelaenus* in yellow fever hotspots: new findings from Santa Catarina State, southern Brazil

Sabrina Fernandes Cardoso^{1,2}, Iara Carolini Pinheiro¹, Larissa Akemi Oliveira Kikuti¹,
Andre Akira Gonzaga Yoshikawa¹, André Nóbrega Pitaluga^{3,4}, Luísa Damazio Rona Pitaluga^{1,4/+}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Florianópolis, SC, Brasil

²Secretaria da Saúde do Estado de Santa Catarina, Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Florianópolis, SC, Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

BACKGROUND The *Haemagogus* genus includes nine mosquito species reported in Brazil, each with distinct distribution patterns. *Haemagogus leucocelaenus*, a major yellow fever vector, is widely distributed throughout the country, while *Haemagogus leucophoebus*, a morphologically similar species, has only been identified in Acre State.

OBJECTIVES This study evaluated the presence of *Haemagogus* species in southern Brazil by comparing their morphological and molecular characteristics.

METHODS Mosquitoes were collected from five municipalities in southern Santa Catarina State, Brazil. Each specimen was identified morphologically and photographed. Genomic DNA was extracted, and a Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) gene fragment was amplified using polymerase chain reaction (PCR). The positive amplicons were sequenced for molecular identification.

FINDINGS New records of *Hg. leucocelaenus* were found in Santa Rosa de Lima, Rio Fortuna, Braço do Norte, São Martinho, and Pedras Grandes, located at the southern edge of the Atlantic Forest. This study expands the known distribution of *Hg. leucocelaenus*, the only *Haemagogus* species identified in the area, with 91 specimens collected. Although some specimens exhibited morphological variations that might lead to misidentification as *Hg. leucophoebus*, molecular identification confirmed that all were *Hg. leucocelaenus*.

MAIN CONCLUSIONS This study is the first to report *Hg. leucocelaenus* in Santa Catarina, Brazil, and provides DNA barcoding sequences from southern Brazil. This method offers a reliable alternative for species identification, especially when combined with morphological analysis. Further molecular studies are needed to determine whether the morphological variations observed indicate intraspecific differences.

Key words: yellow fever - *Haemagogus* - *Haemagogus leucocelaenus* - mosquitoes

Yellow fever (YF) is a non-contagious disease caused by the YF virus (YFV), which belongs to the species *Orthoflavivirus flavi*^(1,2) within the *Orthoflavivirus* genus of the *Flaviviridae* family.⁽²⁾ In Brazil, YF is transmitted through two cycles: (i) the sylvatic (or jungle) cycle, involving non-human primates (NHP) and mosquitoes, primarily *Sabethes* spp. (Robineau-Desvoidy, 1827) and *Haemagogus* spp. (Williston, 1896); and (ii) the urban cycle, which has not been reported in Brazil since 1942,⁽³⁾ in which YFV is transmitted to humans by *Aedes* sp. (Meigen, 1818) mosquitoes.

Mosquitoes of the *Haemagogus* genus, key vectors of YFV and other arboviruses,⁽⁴⁾ are acrodendrophylic, diurnal, and commonly inhabit forested areas.⁽⁵⁾ They typically breed in natural containers such as tree holes, bam-

boo internodes, bromeliads, and coconut husks.⁽⁶⁾ This genus consists of 28 species, divided into two subgenera: *Conopostegus* (Dyar, 1925) and *Haemagogus* (Williston, 1896), with a wide distribution across the Americas.^(7,8,5) In Brazil, nine *Haemagogus* species have been reported, including *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) and *Haemagogus leucophoebus* (Galindo, Carpenter & Trapido, 1953) (from the *Conopostegus* subgenera), as well as *Haemagogus janthinomys* (Dyar, 1921), *Haemagogus tropicalis* (Cerqueira & Antunes, 1938), *Haemagogus spegazzinii* (Brèthes, 1912), *Haemagogus baresi* (Cerqueira, 1960), *Haemagogus capricornii* (Lutz, 1904), *Haemagogus albomaculatus* (Theobald, 1903), and *Haemagogus celeste* (Dyar & Nuñez Tovar, 1927),⁽⁹⁾ all of which belong to the *Haemagogus* subgenera.⁽¹⁰⁾

doi: 10.1590/0074-02760240240

ANP and LDRP contributed equally to this work.

+ Corresponding author: luisa.rona@ufsc.br

https://orcid.org/0000-0002-3400-3950

Received 22 October 2024

Accepted 28 March 2025

How to cite: Cardoso SF, Pinheiro IC, Kikuti LAO, Yoshikawa AAG, Pitaluga AN, Rona LDP. Expanded range of *Haemagogus leucocelaenus* in yellow fever hotspots: new findings from Santa Catarina State, southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2025; 120: e240240.



Haemagogus leucocelaenus, an important vector of YFV in Brazil,⁽⁴⁾ is found throughout the country, from the northern to the southern regions.⁽¹⁰⁾ This species is morphologically similar to *Hg. leucophoebus*,⁽¹¹⁾ whose only recorded occurrence dates back to the 1950s in Acre State.^(11,12,13) The scarce documentation of *Hg. leucophoebus* in Brazil may be due to challenges in its morphological identification. Females of *Hg. leucophoebus* and *Hg. leucocelaenus* are very similar, and according to the main taxonomic keys by Forattini⁽⁶⁾ and Consoli & Lourenço-de-Oliveira,⁽¹⁰⁾ they can only be distinguished by a few specific features on the head, such as setae. As a result, relying solely on morphology for accurate identification can be challenging. To address this issue, this study aimed to (I) assess the presence of *Haemagogus* mosquitoes in Santa Catarina, Brazil, given that *Hg. leucocelaenus*, a significant vector of YFV, has never been collected in the state,⁽¹⁴⁾ and (II) characterise these specimens using Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) sequences.

MATERIALS AND METHODS

Entomological collection and morphological identification - The study was conducted in forested ecosystems within a microregion of southern Santa Catarina State, Brazil (Fig. 1). The detection of YFV in this region by the Directorate of Epidemiological Surveillance in February 2021⁽¹⁵⁾ prompted subsequent entomological collections. Sampling sites were selected based on the geographical presence of non-human primates diagnosed with YFV. The chosen locations were San-

ta Rosa de Lima (-28.032639, -49.149684), Rio Fortuna (-28.141177, -49.146304), Braço do Norte (-28.195246, -49.136690), São Martinho (-28.127728, -49.051721), and Pedras Grandes (-28.514485, -49.242145) (Fig. 1).

Collections took place during the summer months of 2023, in January and February. Sampling occurred between 08:00 and 17:00 over three consecutive days in each municipality. Mosquitoes were captured in the canopy and at ground level using a manual collection net and an oral aspirator with protected human attraction. Additionally, four CDC light traps (CDC-LT), powered by carbon dioxide (dry ice), were set up in the canopy.

The captured insects were preserved on dry ice during transport to the laboratory, where they were stored in cryotubes at -80°C. *Haemagogus* specimens were morphologically identified using a stereomicroscope (SZX16 Olympus) on a cold surface, following the taxonomic keys of Consoli and Lourenço-de-Oliveira⁽¹⁰⁾ and Forattini.⁽⁶⁾

Ethics considerations - All members of the research team had been vaccinated against YFV before the study. Additionally, to reduce the risk of exposure to pathogens, the field team wore personal protective equipment, including long-sleeved clothing, caps, and boots.

Molecular analysis - Molecular identification was performed on 17 *Hg. leucocelaenus* mosquitoes, nine of which showed morphological variations typical of *Hg. leucophoebus* (Table). All specimens were photographed individually before molecular analysis.

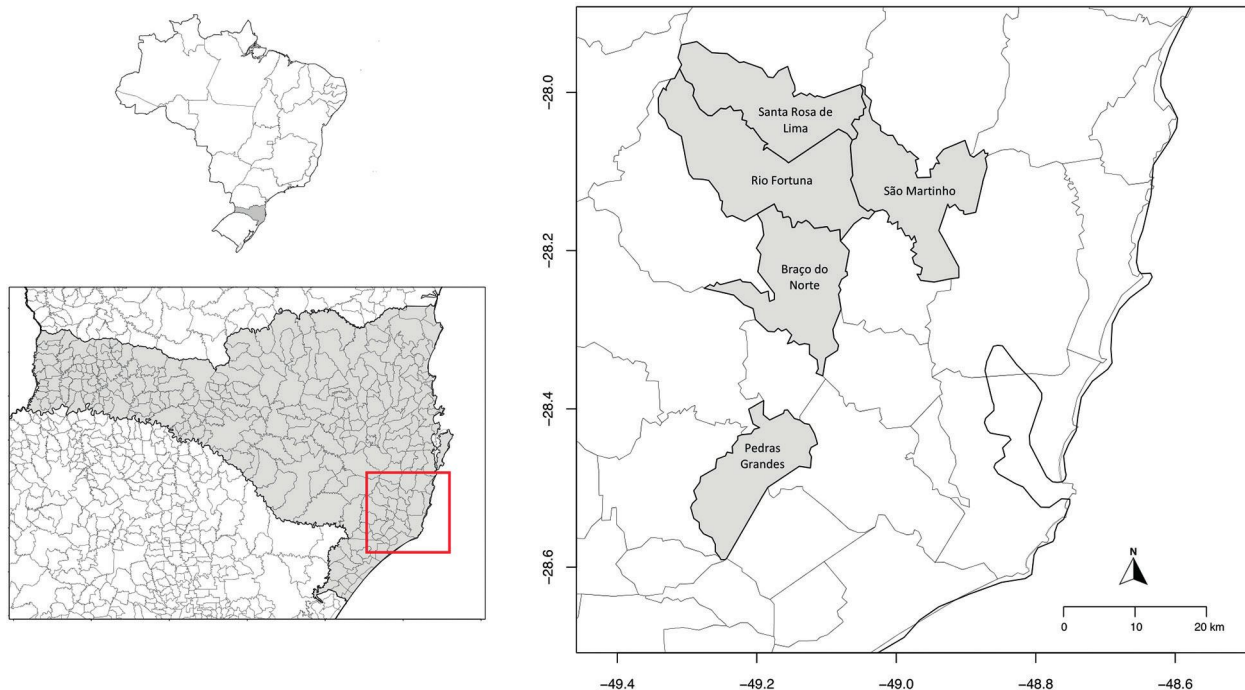


Fig. 1: collection sites for *Haemagogus* mosquitoes in Santa Catarina, Brazil. In the upper left, a map of Brazil shows the State of Santa Catarina (SC) highlighted in grey. Below it, a magnified view of SC is presented. On the right, a zoomed-in section of the SC map (marked by a red box) highlights the specific sample collection sites, which are indicated in grey. The x-axis and y-axis of this zoomed-in map represent longitude and latitude, respectively. The maps were created using the *sf*, *maps*, and *mapdata* packages^(26,27,28,29) in R Software, version 4.3.1.⁽³⁰⁾

TABLE
Overview of *Haemagogus leucocelaenus* specimen data

Sample ID	Municipality	Technique	Strata
513*	Rio Fortuna	Hand-net/oral aspirator	Canopy
514*	Rio Fortuna	Hand-net/oral aspirator	Canopy
1719*	Braço do Norte	CDC-LT	Canopy
1966*	São Martinho	CDC-LT	Canopy
2137*	São Martinho	Hand-net/oral aspirator	Ground
2138*	São Martinho	Hand-net/oral aspirator	Ground
2141*	São Martinho	Hand-net/oral aspirator	Ground
2210*	São Martinho	Hand-net/oral aspirator	Canopy
2212*	São Martinho	Hand-net/oral aspirator	Canopy
50	Santa Rosa de Lima	Hand-net/oral aspirator	Canopy
192	Santa Rosa de Lima	Hand-net/oral aspirator	Canopy
197	Santa Rosa de Lima	Hand-net/oral aspirator	Canopy
202	Santa Rosa de Lima	Hand-net/oral aspirator	Canopy
386	Rio Fortuna	Hand-net/oral aspirator	Canopy
713	Rio Fortuna	CDC-LT	Canopy
714	Rio Fortuna	CDC-LT	Canopy
927	Rio Fortuna	Hand-net/oral aspirator	Ground

Sample ID: identifier assigned to each specimen collected during the study; Municipality: city where each specimen was collected in Santa Catarina State; Technique: capture method used, including manual collection and CDC Light Trap with dry ice (CDC-LT); Strata: collection levels, categorised as canopy or ground. **Haemagogus leucocelaenus* displaying morphological variations typical of *Hg. leucophoebus*.^(7,8)

Genomic DNA was extracted from each specimen individually using the DNeasy Blood & Tissue Kit (69501 - Qiagen). The primers KUM07-F 5' GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CCT T 3' and KUM07-R 5' AAA AAT TTT AAT TCC AGT TGG AAC AGC 3'⁽¹⁶⁾ were used to amplify ~700 base pairs of the COI 5' region, with the forward primer binding near position 200 in the *Hg. leucocelaenus* COI gene sequence (accession number MN531847.1), which is about 1,500 base pairs long. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using an Applied Biosystems® thermocycler under the following conditions: one cycle of 95°C for 9 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 50°C for 45 s, and 72°C for 45 s, with a final cycle of 7 min at 72°C. Positive amplicons were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega) and sequenced (forward and reverse) using the ABI Prism 3730 DNA sequencer at the Oswaldo Cruz Institute and the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, USA).

The sequence quality was verified using CHROMAS version 2.4 software, and consensus sequences were assembled with SeqMan version 7.0. Molecular identification was performed using the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database. COI DNA sequence alignments were generated using ClustalX (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A phylogenetic tree was generated using IQ-Tree version 2.1.2⁽¹⁷⁾ with the Maximum Likelihood method and the best-fit substitution model TIM2+F+I. The resulting

IQTREE file was then uploaded to the iTOL (Interactive Tree of Life) platform⁽¹⁸⁾ for visualisation. The analysis included *Hg. leucocelaenus* sequences from different regions of Brazil and Trinidad, with the following accession numbers: PP915664 (São Paulo), PP372854.1, MH118162.1, MH118163.1, PP372855.1, PP372856.1 (Sergipe), MN531847.1 (Pará), and MT987602 (Trinidad). Sequences from *Hg. spegazzinii* and *Hg. capricornii* (accession numbers MH118155.1 and PP915673.1, respectively) were used as outgroups.

RESULTS AND DISCUSSION

During the study period, 91 females of the genus *Haemagogus* were captured across five municipalities in southern Santa Catarina, Brazil. The only species identified was *Hg. leucocelaenus*. However, morphological variations were noted in 22 specimens, leading to potential misidentification with *Hg. leucophoebus* (hereafter referred to as *Hg. leucocelaenus**). *Hg. leucocelaenus* specimens were collected as follows: Braço do Norte (38 mosquitoes), Pedras Grandes (2), Rio Fortuna (6), Santa Rosa de Lima (6), and São Martinho (17). Additionally, *Hg. leucocelaenus** specimens showing morphological variations were found in Braço do Norte (6), Pedras Grandes (6), Rio Fortuna (2), and São Martinho (8).

Morphological analysis - All 91 identified *Haemagogus* specimens exhibited a scutum covered with dark scales, featuring acrostichal, prealar, and prescutellar lines or patches of silvery scales, as well as pleura with vertical lines of silvery scales (Fig. 2).

Notable morphological variations were observed in the *Hg. leucocelaenus* specimens: (i) Proepisternal setae differed, with *Hg. leucocelaenus* having one long seta, while *Hg. leucocelaenus** specimens exhibited three, a trait typical of *Hg. leucophoebus* (Fig. 3),^(6,10) (ii) The erect scales on the head varied, with *Hg. leucocelaenus** having scales that were entirely black or dark brown (characteristic of *Hg. leucophoebus*), whereas *Hg. leucocelaenus* had entirely pale brown scales (Fig. 4).^(6,10)

Galindo et al.⁽¹¹⁾ previously noted that distinguishing *Hg. leucocelaenus* from *Hg. leucophoebus* based on adult morphology is challenging due to reliance on structures or coloration that may be difficult to observe

- factors that might have been overlooked in their study. Similarly, Zavortink⁽¹⁹⁾ reported variations in the colour of the erect scales on the occiput of *Hg. leucocelaenus* from Trinidad, Brazil, and Argentina, with Trinidad specimens showing dark brown scales akin to those of *Hg. leucophoebus* in Brazil.⁽¹¹⁾ Marcondes and Alencar⁽¹²⁾ highlighted the importance of further research to explore potential regional morphological variations in *Hg. leucocelaenus*.

Molecular analysis - Molecular analyses were conducted on eight *Hg. leucocelaenus* and nine *Hg. leucocelaenus** specimens (Table) to confirm the identity of *Hg. leucocelaenus**, which showed morphological variations

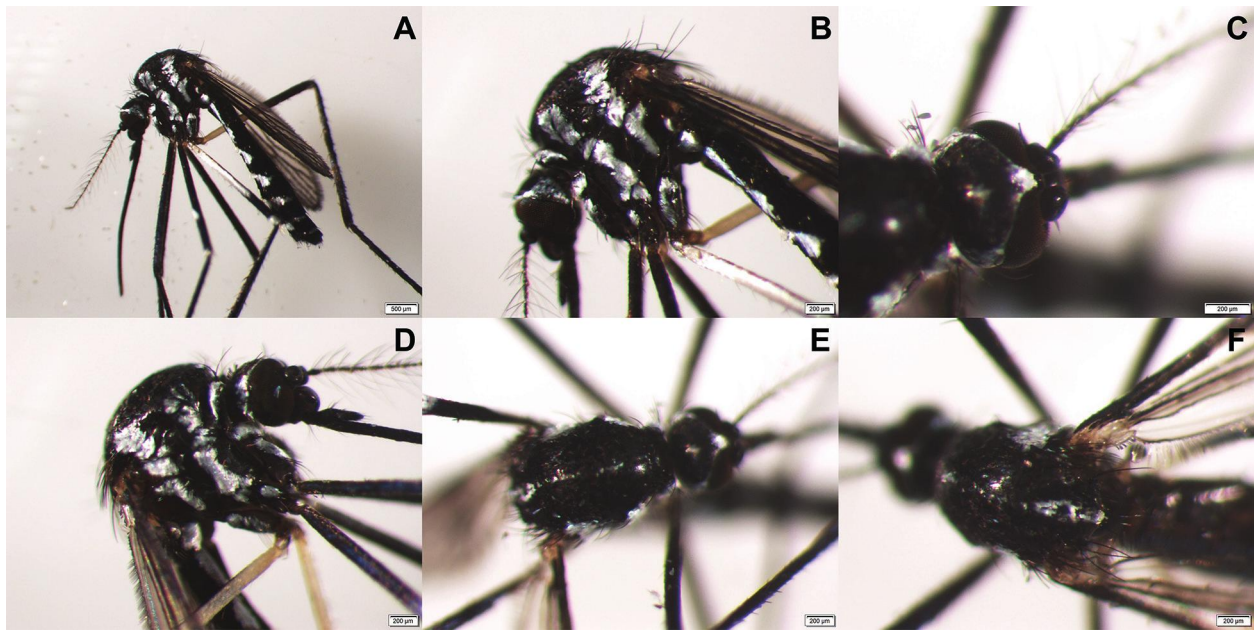


Fig. 2: morphology of *Haemagogus* mosquitoes. (A) Lateral view of the whole mosquito. (B, D) Close-up lateral view highlighting the pleura with vertical bands of silvery scales. (C) Dorsal view of the head showing the vertex. (E) Dorsal view showing the scutum covered by dark scales, with acrostichal, prealar, and prescutellar lines or patches of silvery scales. (F) Dorsal view of the final portion of the scutum and the scutellum.^(6,10)

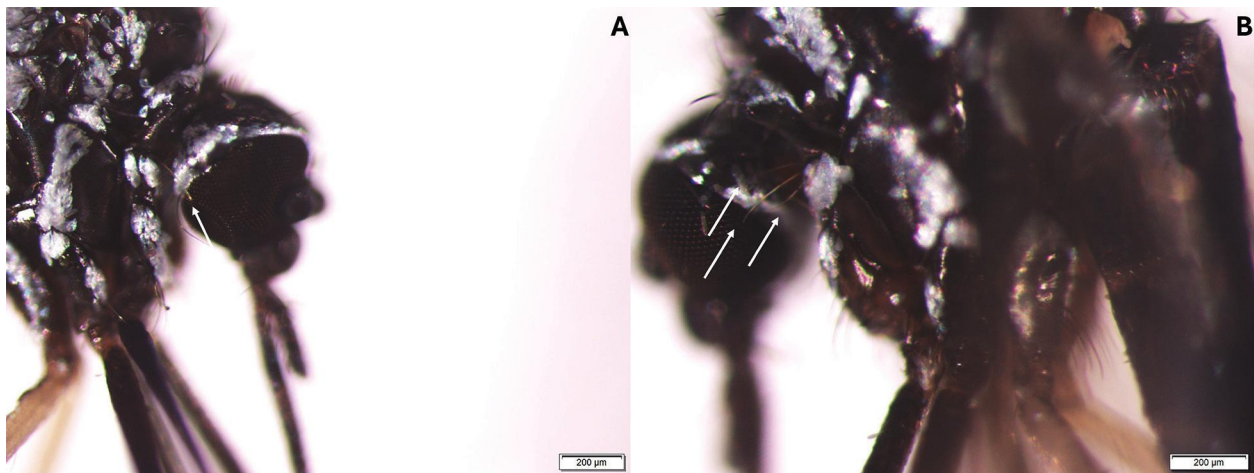


Fig. 3: comparison of proepisternal setae in *Haemagogus* mosquitoes: (A) *Haemagogus leucocelaenus*, characterised by one long seta (indicated by the white arrow). (B) *Haemagogus leucocelaenus**, exhibiting three long setae (indicated by the white arrows), a trait typical of *Hg. leucophoebus*.^(6,10)

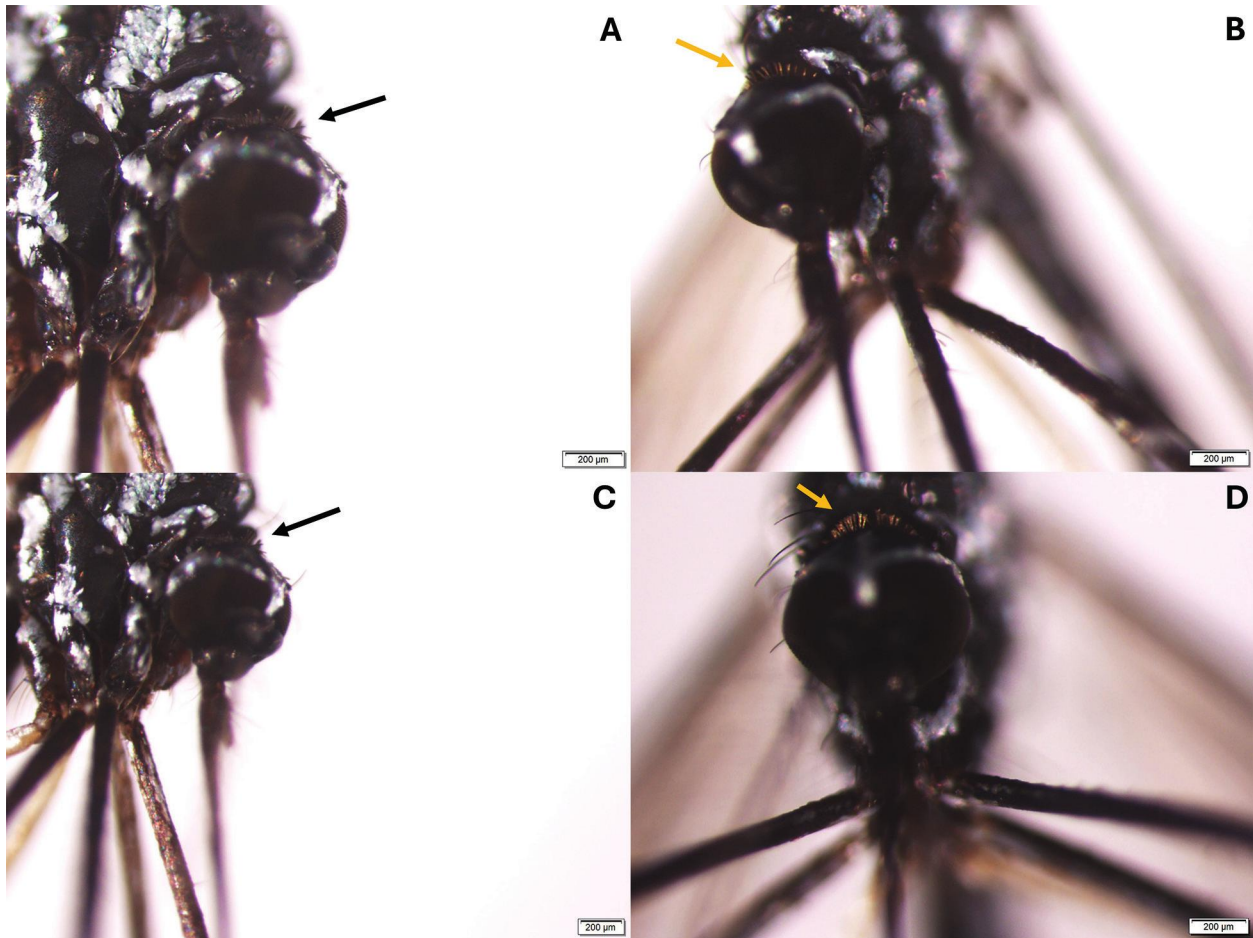


Fig. 4: comparison of erect scales on the heads of *Haemagogus* mosquitoes: (A, C) *Haemagogus leucocelaenus**, featuring erect scales that are entirely black (indicated by the black arrows), a trait typical of *Hg. leucophoebus*. (B, D) *Haemagogus leucocelaenus*, characterised by erect scales that are entirely pale brown (indicated by the yellow arrows).^(6,10)

typical of *Hg. leucophoebus*, a species previously identified only in Acre. The 5' COI region of mitochondrial DNA was sequenced, with the resulting sequences (approximately 560 to 700 base pairs) submitted to GenBank under accession numbers PQ042427 to PQ042443.

All 17 sequences exhibited a completely monomorphic COI genetic profile, with no observed nucleotide diversity. Molecular identification through the NCBI database revealed 95% similarity with *Hg. leucocelaenus* and 93% with *Hg. janthinomys*. The differences in similarity values can be explained by the origin of the *Hg. leucocelaenus* NCBI sequence, which is from Canaã dos Carajás, Pará, Brazil,⁽²⁰⁾ 2,500 km from southern Santa Catarina. Mitochondrial DNA has a higher mutation rate than nuclear DNA,⁽²¹⁾ so significant differences can arise between mosquito populations from distant Brazilian regions. Despite this, the identical genetic sequences of all 17 specimens analysed in this study confirm that they belong to the same species. Additionally, the phylogenetic tree (Fig. 5) groups our sequences as a monophyletic clade with *Hg. leucocelaenus* sequences from São Paulo, Sergipe, Pará, and Trinidad, further indicating that all 17 mosquitoes analysed in this study belong to the *Hg. leucocelaenus* species.

Thus, despite the morphological differences, molecular identification confirms that both *Hg. leucocelaenus* and *Hg. leucocelaenus** (which shows morphological variations typical of *Hg. leucophoebus*) are the same species. Morphological variations are also observed in other species. For example, Prudhomme et al.⁽²²⁾ identified morphological differences in wing phenotypes in *Aedes albopictus* (Skuse, 1895), noting variations in shape and size. Similarly, Doorenweerd et al.⁽²³⁾ showed that the morphological differences between *Bactrocera frauenfeldi* (Schiner, 1868) and *Bactrocera albistrigata* (Meijere, 1911) (mango fruit flies) represent intraspecific variation. Likewise, although differences in metasomal band colour visually separate *Xylocopa nigrocincta* (Smith, 1854) and *Xylocopa suspecta* (Moure & Camargo, 1988), Agostini et al.⁽²⁴⁾ found no genetic differences in their COI sequences, suggesting they are not distinct evolutionary lineages. Thus, variations such as differences in the number of setae or the coloration of scales may simply reflect individual differences within the same species. Although COI has proven effective in identifying *Haemagogus* species,⁽²⁵⁾ further studies using additional molecular markers are needed to confirm this hypothesis.

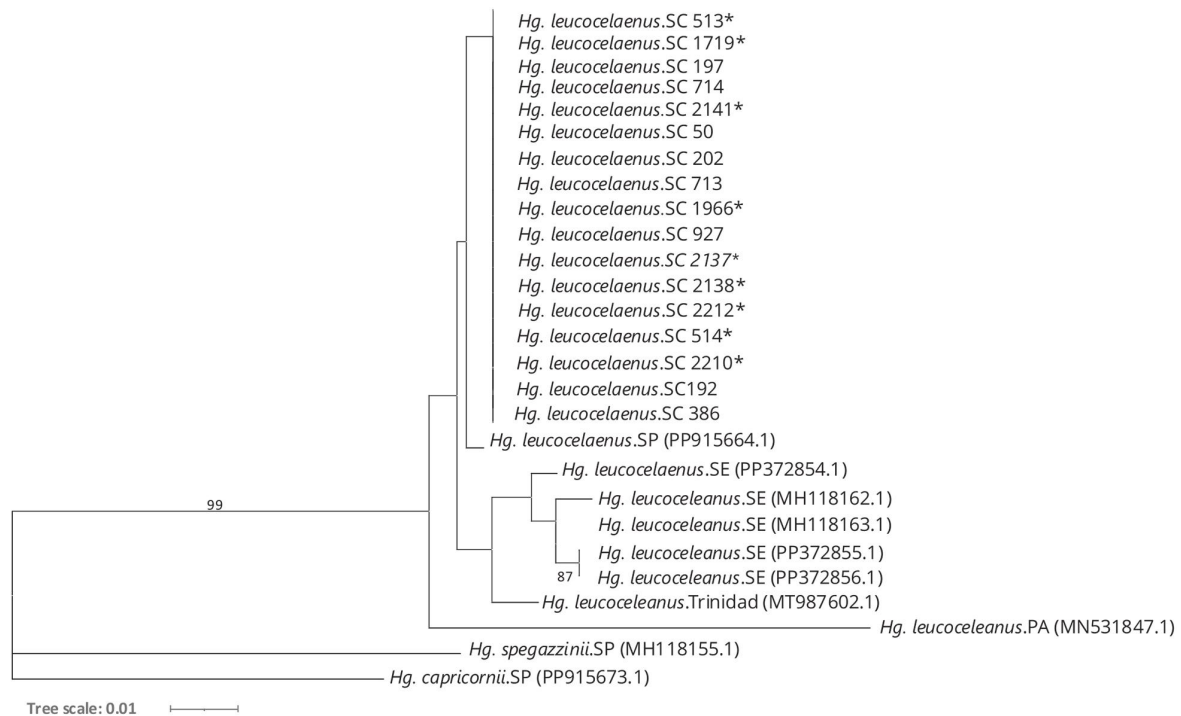


Fig. 5: maximum likelihood tree based on Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) sequences (TIM2+F+I model). This analysis included 17 nucleotide sequences obtained in this study (*Hg. leucocelaenus*.SC), with sample IDs listed alongside the species name (see Table). Additionally, sequences from other regions of Brazil and Trinidad, obtained from GenBank, were included. *Haemagogus spegazzinii* and *Haemagogus capricornii* were used as outgroups (accession numbers provided in parentheses). This phylogenetic analysis strongly supports that all 17 *Hg. leucocelaenus* sequences from Santa Catarina belong to the same species, as they (i) exhibit a completely monomorphic COI genetic profile and (ii) form a monophyletic clade with *Hg. leucocelaenus* sequences from São Paulo, Sergipe, Pará, and Trinidad. Node values represent bootstrap percentages based on 1,000 replications, with only values above 75% displayed. **Haemagogus leucocelaenus* displaying morphological variations typical of *Hg. leucophoebus*. SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; SE: Sergipe; PA: Pará.

Recording and identifying the species responsible for YF transmission in epizootic areas is essential for effective disease control. This study is the first to report the presence of *Hg. leucocelaenus* in Santa Catarina, Brazil, and to provide DNA barcoding sequences for this species from southern Brazil. This is a key step in accurately identifying YFV vector species in South America.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários at Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz/RJ for its support in species identification. We also acknowledge the Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) at UFSC for providing the infrastructure and equipment used in this study.

AUTHORS' CONTRIBUTION

SFC, ICP, AAGY, and LAOK contributed to data generation and analysis; SFC and LAOK conducted mosquito collection and morphological identification; SFC, ICP, AAGY and LAOK drafted the manuscript; ANP and LDPR assisted in manuscript preparation by critically reviewing the original draft; ANP and LDPR were the principal investigators, participating in the study's design and coordination. All authors read and approved the final version. The authors declare no competing interests. This paper is part of Sabrina Fernandes Cardoso's thesis for the Graduate Programme in Cell and Developmental Biology (PPGBCD) at the Federal University of Santa Catarina (UFSC).

REFERENCES

1. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. J Clin Virol. 2015; 64: 160-73.
2. Postler TS, Beer M, Blitvich BJ, Bukh J, de Lamballerie X, Drexler JF, et al. Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. Arch Virol. 2023; 168: 224.
3. Giovanetti M, Pinotti F, Zanluca C, Fonseca V, Nakase T, Koishi AC, et al. Genomic epidemiology unveils the dynamics and spatial corridor behind the yellow fever virus outbreak in Southern Brazil. Sci Adv. 2023; 9: eadg9204.
4. Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos AACD, Miranda RM, Bonelly IS, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. Emerg Microbes Infect. 2019; 8: 218-31.
5. Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. Contributions of the American Entomological Institute. 1973; 174 pp.
6. Forattini OP. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia. vol. 2. São Paulo: EDUSP; 2002. 864 pp.
7. Wilkerson RC, Linton YM, Strickman D. Mosquitoes of the World. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press; 2021. 1308 pp.
8. Silva-Inacio CL, Paiva AAP, Araújo JMG, Ximenes MFFM. Ecological relationships of *Haemagogus spegazzinii* (Diptera: Culicidae) in a semiarid area of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020; 53: e20200502.

9. Alencar J, Castro FC, Monteiro HAO, Silva OV, Dégallier N, Marcondes CB, et al. New records of *Haemagogus* (*Haemagogus*) from northern and northeastern Brazil (Diptera: Culicidae, Aedini). Zootaxa. 2008; 1779: 65-8.
10. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994. 228 pp.
11. Galindo P, Carpenter SJ, Trapido H. The taxonomic status of the *Aedes leucocelaenus* complex with descriptions of two new forms (Diptera, Culicidae). Ann Entomol Soc Am. 1952; 45(4): 529-42.
12. Marcondes CB, Alencar J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. Rev Biomed. 2010; 21(3): 221-38.
13. Gomes AC, Torres MAN, Paula MB, Fernandes A, Marassá AM, Consales CA. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizooticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. Epidemiol Serv Saúde. 2010; 19(2): 101-13.
14. Li S, Acosta A, Hill S, Brady O, de Almeida M, Cardoso J, et al. Mapping environmental suitability of *Haemagogus* and *Sabethes* spp. mosquitoes to understand sylvatic transmission risk of yellow fever virus in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2022; 16: e0010019.
15. DIVE/SES-SC - Diretoria de Vigilância Epidemiológica/Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. Situação da febre Amarela em Santa Catarina. Florianópolis: DIVE/SES-SC; 2021.
16. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2007; 44: 1-7.
17. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Mol Biol Evol. 2015; 32: 268-74.
18. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Res. 2021; 49: W293-6.
19. Zavortink TJ. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXVIII. The New World species formerly placed in *Aedes* (*Finlaya*). Contr Am Ent Inst. 1972; 8: 1-206.
20. da Silva FS, Cruz ACR, Medeiros DBA, da Silva SP, Nunes MRT, Martins LC, et al. Mitochondrial genome sequencing and phylogeny of *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus spegazzinii*, and *Haemagogus tropicalis* (Diptera: Culicidae). Sci Rep. 2020; 10: 16948.
21. Rong Z, Tu P, Xu P, Sun Y, Yu F, Tu N, et al. The mitochondrial response to DNA damage. Front Cell Dev Biol. 2021; 9: 669379.
22. Prudhomme J, Velo E, Bino S, Kadriaj P, Mersini K, Gunay F, et al. Altitudinal variations in wing morphology of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Albania, the region where it was first recorded in Europe. Parasite. 2019; 26: 55.
23. Doorendeerd C, Jose MS, Geib S, Dupuis J, Leblanc L, Barr N, et al. A phylogenomic approach to species delimitation in the mango fruit fly (*Bactrocera frauenfeldi*) complex: a new synonym of an important pest species with variable morphotypes (Diptera: Tephritidae). Systematic Entomology. 2022; 48: 10-22.
24. Agostini JC, Françoise E, Arias MC, Zanella FCV. Morphological and molecular evidence for considering *Xylocopa nigrocineta* as the senior synonym of *Xylocopa suspecta* (Apidae: Xylocopini). Apidologie. 2024; 55: 18.
25. Telles-de-Deus J, Guimarães LO, Rocha EC, Helfstein VC, Reginato SL, Mucci LF, et al. COI DNA barcoding to differentiate *Haemagogus janthinomys* and *Haemagogus capricornii* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 2024; 259: 107377.
26. Pebesma E, Bivand R. Spatial data science: with applications in R. 1st ed. Boca Raton: Chapman and Hall; 2023. 314 pp.
27. Pebesma E. Simple features for R: standardized support for spatial vector data. R Journal. 2018; 10: 439-46.
28. Becker RA, Wilks AR, Minka TP, Deckmyn A. maps: draw geographical maps. R package version 3.4.2. 2023. Available from: <https://cran.r-project.org/package=maps>.
29. Becker RA, Wilks AR, Brownrigg R. mapdata: Extra map databases. R package version 2.3.1. 2022. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/mapdata/index.html>.
30. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014.

3.3 CAPÍTULO III – ASSESSING THE SYLVATIC YELLOW FEVER VECTORS IN SOUTHERN BRAZIL

Artigo científico: Assessing the Sylvatic Yellow Fever Vectors in Southern Brazil

Referência Bibliográfica: Cardoso SF, Kikute LAO, Yoshikawa AAG, Pinheiro IC, Guesser JVC, Neves MSAS, Couto-Lima D, Gatti RR, Prophiro JS, Pitaluga AN, Rona LDP. Assessing the Sylvatic Yellow Fever Vectors in Southern Brazil. 2025.

Situação do manuscrito: Será submetido em outubro de 2025 à revista *Insects*.

A família Culicidae constitui um grupo taxonômico diversificado e amplamente distribuído de mosquitos, englobando mais de 3.700 espécies organizadas em 113 gêneros, com ocorrência nas regiões temperadas e tropicais de todo o mundo. Diversas dessas espécies são reconhecidas como vetores de patógenos que afetam seres humanos, desempenhando papel relevante na morbimortalidade global. Dentre as doenças transmitidas por culicídeos, destaca-se a febre amarela. O terceiro capítulo desta tese tem como foco a investigação da fauna silvestre de culicídeos e a detecção de infecção natural pelo YFV em uma microrregião do Sul do Estado de SC, área impactada por um surto de febre amarela silvestre ocorrido em 2021.

Os materiais suplementares referentes ao artigo apresentado no Capítulo III estão acessíveis na seção 3.3.1, ao final do manuscrito.

Avaliação dos vetores da febre amarela silvestre no Sul do Brasil

Sabrina F. Cardoso^{1,2*}, Larissa Akemi Oliveira Kikuti¹, Andre Akira Gonzaga Yoshikawa¹, Iara Carolini Pinheiro¹, João Victor Costa Guesser¹, Maycon Sebastião Alberto Santos Neves³, Dinair Couto-Lima³, Renata Rispoli Gatti², Josiane Somariva Prophiro⁴, André N. Pitaluga^{5,6¶}, Luísa D. P. Rona^{1,6¶*}

Afiliações

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Florianópolis, SC, Brasil.

²Secretaria da Saúde do Estado de Santa Catarina, Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Florianópolis, SC, Brasil.

³Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Tubarão, Brasil.

⁵Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁶Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¶ Equal senior authors

*Corresponding authors: sabrinalogia@hotmail.com, luisa.rona@ufsc.br

Endereços de e-mail

SFC: sabrinalogia@hotmail.com

LAOK: larissaakemi103@gmail.com

AAGY: a.akira.g.yoshikawa@gmail.com

ICP: pinheiro.iaracarolini@gmail.com

JVCG: joaoavatar1209@gmail.com

MSASN: mayconsn@ioc.fiocruz.br

DCL: dcouto@ioc.fiocruz.br

RRG: gattirr@saude.sc.gov.br

JSP: josiane.prophiro@hotmail.com

ANP: pitaluga@ioc.fiocruz.br

LDPR: luisa.rona@ufsc.br

Resumo

A febre amarela é uma doença infecciosa causada pelo vírus da febre amarela (YFV), um arbovírus da família Flaviviridae. É transmitida pela picada de mosquitos infectados pertencentes à família Culicidae e afeta humanos e primatas não humanos (PNHs). Este estudo teve como objetivo investigar a fauna silvestre de Culicidae e a ocorrência de infecção natural pelo YFV em uma microrregião do Sul de Santa Catarina, Brasil, área recentemente afetada por um surto de febre amarela silvestre. Coletas entomológicas foram realizadas entre janeiro e fevereiro de 2023 em cinco municípios com circulação viral confirmada. A infecção natural pelo YFV foi avaliada por RT-LAMP. Foram coletadas 4.352 fêmeas de culicídeos, representando pelo menos 32 espécies, incluindo vários vetores-chave do YFV. *Haemagogus leucocelaenus* foi identificado em todos os municípios amostrados, enquanto *Haemagogus janthinomys*, o principal vetor do vírus da febre amarela silvestre no Brasil, não foi detectado. Mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus*, *Psorophora* e *Sabethes* foram testados para o vírus da febre amarela. Apenas um *pool*, composto por *Sabethes albiprivus*, apresentou resultado positivo, resultando em uma taxa mínima de infecção (TMI) de 11,6. Este é o primeiro registro de infecção natural pelo YFV em *Sa. albiprivus* no Sul do Brasil e apenas o terceiro caso relatado globalmente, destacando seu potencial papel como vetor secundário na manutenção da circulação viral em ambientes silvestres. Com base na presença e abundância da espécie, sugerimos que *Hg. leucocelaenus* tenha atuado como o principal vetor do YFV na área de

estudo. A composição da fauna culicídic, aliada à detecção do YFV em vetores silvestres, indica um risco epidemiológico contínuo. Essas descobertas ressaltam a necessidade de fortalecer a vigilância entomológica e expandir a cobertura da vacinação contra a febre amarela nas regiões afetadas e vizinhas.

Palavras-chave: Febre amarela, *Sabethes*, *Haemagogus*, *Aedes*, *Psorophora*

Introdução

A família Culicidae (Meigen, 1818) é um grupo grande e abundante que ocorre em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo. A família compreende 3.729 espécies, distribuídas em 113 gêneros [1]. Dentre todos os membros da família Culicidae, aproximadamente 150 espécies estão envolvidas na transmissão de doenças aos humanos, impactando a morbidade e a mortalidade, sendo a febre amarela uma dessas doenças [2]. A febre amarela é uma doença infecciosa causada pelo vírus da febre amarela (YFV) [3], membro da família *Flaviviridae*, da espécie *Orthoflavivirus flavi* [4]. É transmitida por culicídeos a humanos e primatas não humanos (PNH) [3]. Do ponto de vista epidemiológico, a febre amarela pode ser classificada em duas formas distintas no Brasil: silvestre e urbana. Essas formas apresentam diferenças significativas em relação à natureza dos vetores transmissores, aos hospedeiros vertebrados envolvidos e aos locais de ocorrência [3]. Não há registros da ocorrência do ciclo urbano no país desde 1942. Enquanto *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) atua como vetor no ciclo urbano, espécies pertencentes aos gêneros *Haemagogus* (Williston, 1896) e *Sabethes* (Robineau-Desvoidy, 1827) desempenham esse papel no ciclo silvestre, sendo classificadas como vetores silvestres primários e secundários, respectivamente [5]. O principal vetor do ciclo silvestre nas Américas é *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* (Dyar, 1921), amplamente distribuído no Brasil [6]. No entanto, outras espécies pertencentes ao gênero *Aedes* (Meigen, 1818), além do *Aedes aegypti*, foram detectadas naturalmente infectadas com o YFV [5, 7]. Da mesma forma, espécimes do gênero *Psorophora* (Robineau-Desvoidy, 1827) também foram

identificados como portadores naturais do vírus [3, 8] e, portanto, são considerados vetores potenciais. A febre amarela é endêmica na África Subsaariana, América Central e do Sul e Caribe [9], causando milhares de casos e mortes anualmente na África e na América do Sul, apesar da existência de vacinas eficazes [5]. A febre amarela ainda causa grandes surtos no Brasil; o ressurgimento do vírus detectado em 2016 causou o pior surto de febre amarela silvestre dos últimos 80 anos, afetando humanos e PNHs [10,11]. O vírus se espalhou da Venezuela para a Amazônia brasileira e, em seguida, para o interior do Centro-Oeste e Sudeste, circulando nas áreas costeiras da Mata Atlântica e alcançando rapidamente o Sul, onde persistiu pelo menos até o final de 2021 [11, 12]. Vários estudos foram conduzidos para identificar potenciais vetores da febre amarela no Brasil [13, 5, 14, 15, 16]. Não há registros da fauna de mosquitos silvestres no estado de Santa Catarina, localizado no Sul do Brasil. Portanto, é essencial estudar mosquitos silvestres com relevância epidemiológica para a transmissão do vírus na região. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar mosquitos silvestres em uma microrregião no Sul de Santa Catarina, que foi afetada por um surto recente de febre amarela silvestre. Além disso, a infecção natural pelo YFV em potenciais vetores foi investigada, visando entender o papel desses mosquitos na disseminação do surto.

Materiais e Métodos

Declaração de Ética

Todos os membros da equipe de pesquisa foram vacinados contra a febre amarela antes do início do estudo. Para minimizar o risco de exposição a patógenos durante o trabalho de campo, a equipe também utilizou equipamentos de proteção individual, incluindo roupas de mangas compridas, gorros e botas.

Área de Estudo

As atividades entomológicas foram realizadas em uma microrregião no Sul do estado de Santa Catarina, Brasil. O clima do local é tropical temperado com vegetação composta por fragmentos florestais remanescentes da Mata Atlântica [17]. Em fevereiro de 2021, pela primeira vez, foi detectada a circulação do YFV na região, por meio da detecção de PNH infectados com o vírus [18]. Portanto, as coletas foram realizadas nos municípios com circulação viral comprovada, a saber: Santa Rosa de Lima, Rio Fortuna, Braço do Norte, Pedras Grandes e São Martinho.

Coleta entomológica e identificação de espécies

Fêmeas adultas de mosquitos da família Culicidae foram coletadas durante o verão de 2023, especificamente em janeiro e fevereiro. A amostragem foi realizada entre 8h e 17h, durante três dias consecutivos, em cada município. Em cada coleta, os mosquitos foram capturados simultaneamente na copa das árvores e ao nível do solo, utilizando uma rede entomológica e um aspirador oral tipo Castro com atração humana protegida. Além disso, quatro armadilhas luminosas do tipo CDC, utilizando dióxido de carbono (gelo seco), foram instaladas na copa. Após a coleta, os espécimes foram armazenados e transportados em gelo seco. No laboratório, os mosquitos foram identificados morfológicamente com um estereomicroscópio (SZX16 Olympus) sob uma superfície fria. Chaves taxonômicas para culicídeos [19, 6, 20] foram utilizadas para identificar o gênero e a espécie. Os espécimes capturados dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes*, *Aedes* e *Psorophora* foram agrupados em *pools* contendo ≤ 10 indivíduos cada, de acordo com a espécie e local de coleta, e armazenados a -80°C para posterior detecção viral.

Identificação molecular do YFV em mosquitos

RT-LAMP colorimétrico (kit WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix 2X - New England BioLabs, Protocolo M1800) foi realizado para investigar a infecção pelo YFV em mosquitos silvestres capturados. O ensaio RT-LAMP teve como alvo os genes NS1, NS5 e E do genoma viral, utilizando os primers e as condições de amplificação descritos por Cardoso *et al.* [18],

com tempo de incubação otimizado para 60 minutos. Os resultados foram interpretados visualmente, com rosa indicando resultados negativos e amarelo indicando resultados positivos, e registrados com a câmera de um smartphone.

Extração do RNA viral

Para a extração do RNA viral, cada *pool* de mosquitos foi macerado em 250 µL de água e 2,5 µL de RNA *secure*. Após uma breve centrifugação, o RNA foi extraído de 140 µL do sobrenadante utilizando o QIAmp Viral Mini Kit (52904 - Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise de dados

A análise dos dados quantitativos e qualitativos relacionados à fauna de mosquitos capturados foi realizada utilizando o software Microsoft Excel. A abundância relativa é calculada pela divisão do número de mosquitos de uma espécie. A taxa mínima de infecção (TMI) nos mosquitos identificados com o YFV foi calculada pela divisão do número de *pools* positivos pelo número total de mosquitos da mesma espécie processados, multiplicado por 1000 [5]. O mapa foi gerado utilizando o Sistema de Informação Geográfica Quantum (QGIS - versão 3.34) [21].

Resultados

Abundância e diversidade da fauna de culicídeos silvestres

Durante o período do estudo, foram realizadas 15 coletas de mosquitos silvestres em 5 municípios. As 4.352 fêmeas capturadas estavam distribuídas em 46 táxons diferentes dentro da família Culicidae. Trinta e dois espécimes foram identificados em nível de espécie e 14 gêneros.

Os espécimes mais frequentes foram *Trichoprosopon digitatum townsendi* (Stone, 1944) 20,8%, *Wyeomyia* sp. (Theobald, 1901) 17,2%, *Limatus* sp. (Theobald, 1901) 13,1%, *Limatus*

durhamii (Theobald, 1901) 8,8%, *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848) 5,1% e *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (Von Humboldt, 1819) 4,3%. *Trichoprosopon townsendi* foi uma das espécies mais frequentemente registradas em todas as coletas realizadas, destacando-se como a mais abundante nos municípios de Braço do Norte e Rio Fortuna, com 278 e 100 indivíduos, respectivamente. No município de Pedras Grandes, o gênero *Wyeomyia* foi predominante, totalizando 284 espécimes. Em São Martinho, a espécie mais abundante foi *Limatus* sp., com 462 indivíduos coletados, enquanto em Santa Rosa de Lima, *Psorophora ferox* foi a espécie dominante, representada por 54 espécimes. Do total de mosquitos coletados, 2,4% foram identificados como pertencentes ao gênero *Haemagogus*. A espécie *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) foi registrada em ambos os estratos da vegetação: solo e dossel, sendo amostrada em todos os municípios investigados e correspondendo a 2,1% do total de indivíduos coletados. Os mosquitos do gênero *Sabethes* representaram 5,1% dos espécimes identificados, com registros em todos os cinco municípios estudados. A espécie mais frequente dentro deste gênero foi *Sabethes (Sabethes) albiprivus* (Theobald, 1903), que correspondeu a 2% do total de culicídeos coletados.

Infecção natural pelo YFV em mosquitos

Para detectar o YFV em mosquitos capturados, foi realizada análise molecular pela técnica RT-LAMP em 154 *pools* de mosquitos. Foram examinados um total de 61 *pools* pertencentes ao gênero *Aedes*, 29 ao *Haemagogus*, 28 ao *Psorophora* e 36 ao gênero *Sabethes*. A investigação molecular detectou apenas um *pool* positivo, correspondente à espécie *Sa. albiprivus*. A amostra positiva foi submetida a novo teste, em triplicata, para confirmação do resultado. Dentre os 36 *pools* de *Sabethes* analisados, apenas o *pool* número 32 apresentou resultado positivo para o YFV. Este *pool* continha 10 espécimes de *Sa. albiprivus*, coletados no município de São Martinho, resultando em uma taxa mínima de infecção (TMI) de 11,63.

Discussão

Este estudo representa a primeira investigação focada na fauna de mosquitos silvestres do Sul do Estado de Santa Catarina, Brasil. A diversidade de culicídeos registrada foi significativa, incluindo gêneros com reconhecida importância epidemiológica. Essa composição natural da comunidade de mosquitos é particularmente relevante, uma vez que a diversidade pode influenciar significativamente o risco de transmissão de patógenos de artrópodes vetores para populações humanas [22].

A abundância de espécimes coletados foi consistente com os achados de Deus [23], em estudo realizado no bioma Mata Atlântica, no estado de São Paulo. Os gêneros *Wyeomyia* e *Limatus* predominaram, juntamente com *Trichoprosopon townsendi*, compreendendo os três táxons mais abundantes nos cinco municípios amostrados. Os resultados obtidos são consistentes com os de estudos anteriores [5,13,23], exceto pela alta frequência de *Trichoprosopon townsendi* observada neste estudo. Em uma investigação realizada em um fragmento de Mata Atlântica no Oeste de Santa Catarina, *Trichoprosopon pallidiventer* (Lutz, 1905) foi a espécie mais frequentemente registrada, representando mais de 59% do total de indivíduos coletados. Esses achados reforçam que espécies do gênero *Trichoprosopon* (Theobald, 1901) podem apresentar alta abundância local [24], o que corrobora os achados do presente estudo.

As espécies de mosquitos *Ae. scapularis* e *Ps. ferox* são frequentemente registradas em grande número em levantamentos de mosquitos [5,13], em consonância com os achados dessa pesquisa.

Aproximadamente 98% dos isolados do YFV de mosquitos obtidos no Instituto Evandro Chagas são dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, e excepcionalmente, espécies dos gêneros *Aedes* e *Psorophora* foram encontradas infectadas [3]. Considerando o exposto, o número de mosquitos capturados e o alto custo das análises moleculares, a investigação da infecção natural pelo YFV foi realizada exclusivamente em espécimes dos gêneros: *Aedes*, *Haemagogus*, *Psorophora* e *Sabethes*.

Sabethes albiprivus tem sido frequentemente coletado em diversos biomas brasileiros, conforme documentado em estudos anteriores [5,15,25]. A espécie foi registrada nos três estados da região Sul do Brasil: Paraná [26], Rio Grande do Sul [7,16] e Santa Catarina [27], evidenciando uma ampla distribuição geográfica nessa área. Além disso, indivíduos infectados com o YFV foram identificados na Argentina [28] e no estado de Minas Gerais, Brasil [15]. Notavelmente, este estudo relata, pela primeira vez, a infecção natural de *Sa. albiprivus* pelo YFV na região Sul do Brasil, sendo este o segundo registro da espécie infectada no país e o terceiro globalmente. Destacando sua relevância para o entendimento da distribuição e epidemiologia do YFV.

Sabethes (Sabethoides) chloropterus (von Humboldt, 1819) foi identificado como o vetor primário e *Sa. albiprivus* como o vetor secundário do YFV no Cerrado brasileiro, apresentando valores de TMI de 5,3 e 3,3, respectivamente [15]. O índice TMI indica a presença de atividade viral no ambiente e um aumento nesse índice indicaria um ciclo de transmissão iminente [29]. Essa descoberta sugere que ambas as espécies podem sustentar a circulação do YFV na ausência de *Haemagogus* sp. [15].

Sa. albiprivus foi anteriormente considerado relevante para a manutenção do YFV, tendo a capacidade de desempenhar um papel secundário na disseminação viral [5]. Além disso, a capacidade da espécie de transmitir o YFV em condições experimentais foi demonstrada [30]. Com base nesses achados e no alto valor de TMI (11,6) registrado em nosso estudo, consideramos que *Sa. albiprivus* pode ter desempenhado um papel secundário na transmissão do YFV na região.

Embora 103 espécimes pertencentes ao gênero *Haemagogus* tenham sido coletados, o RNA viral não foi detectado em nenhum deles. De acordo com Cardoso *et al* [31], 22 dos 91 espécimes de *Hg. leucocelaenus* amostrados neste estudo, apresentaram variações morfológicas compatíveis com *Haemagogus (Conopostegus) leucophoebus* (Galindo, Carpenter & Trapido,

1953). No entanto, análises moleculares confirmaram que todos eles pertencem à mesma espécie, ou seja, *Hg. leucocelaenus*. Este fato destaca a importância de uma identificação taxonômica cuidadosa para minimizar possíveis erros. Considerando a complexidade inerente a este processo, alguns espécimes de culicídeos coletados durante este estudo foram identificados apenas ao nível de gênero.

Haemagogus spp. possuem hábitos primatófilicos e comportamento alimentar arbóreo [5], mas também são capturados ao nível do solo [29], evidências que reforçam os achados deste estudo. Entretanto, *Hg. leucocelaenus* tem sido descrito como oportunista, utilizando múltiplas fontes de alimento, incluindo primatas, aves, marsupiais e roedores [29]. Apresentam maior plasticidade ecológica em relação à dieta e habitats, colonizando fragmentos de floresta secundária e ambientes antropogênicos modificados, quando comparados a *Hg. janthinomys*, que possui exigências ambientais mais restritivas [5]. As coletas realizadas neste estudo ocorreram dois anos após o início do surto de febre amarela silvestre na região, período em que a população local de PNH foi completamente dizimada. Este fator pode ter influenciado a ausência de *Hg. janthinomys* nas amostras, uma vez que a redução drástica de hospedeiros vertebrados pode impactar significativamente a dinâmica populacional e a detecção de vetores associados [32].

Haemagogus leucocelaenus foi considerado o principal vetor do YFV durante o último surto de febre amarela no Brasil, devido à sua alta distribuição, abundância e notáveis taxas de infecção natural [5]. A espécie foi encontrada naturalmente infectada pelo YFV em outras ocasiões [5, 29], inclusive no estado do Rio Grande do Sul, localizado no Sul do Brasil [16].

Haemagogus janthinomys é o principal transmissor da forma silvestre da febre amarela no Brasil [19]. Apesar do esforço amostral realizado, inclusive no dossel, a espécie não foi encontrada durante este estudo. Outra hipótese seria que *Hg. leucocelaenus* tenha atuado como

o principal vetor da febre amarela no recente surto de febre amarela silvestre em Santa Catarina, desempenhando um papel significativo na transmissão do vírus.

Os cinco municípios amostrados neste estudo caracterizam-se por seu pequeno porte, com áreas urbanas localizadas em proximidade direta com ambientes silvestres. Essas localidades são compostas por diversos fragmentos de vegetação, interligados por corredores ecológicos, que facilitam a movimentação dos mosquitos vetores em busca de fontes sanguíneas para a maturação dos ovos [11, 19]. A alta capacidade de dispersão dos vetores do YFV, inclusive entre áreas parcialmente desmatadas [19], e a redução das populações de PNH devido à degradação do habitat natural e às mortes causadas pela febre amarela, favorecem a redução das fontes sanguíneas, o que induz maior dispersão dos mosquitos [11,14]. Nesse contexto, esses municípios configuram-se como áreas de risco para a transmissão do YFV. Diante desse cenário, recomenda-se a implementação de campanhas de vacinação em larga escala contra a febre amarela nesses municípios e suas áreas adjacentes, uma vez que tanto o vírus quanto os vetores silvestres continuam circulando na região.

Conclusão

Este estudo representa o primeiro levantamento da fauna de mosquitos silvestres e investigação da infecção natural pelo YFV no estado de Santa Catarina. Foi encontrado *Sa. albiprivus* naturalmente infectado pelo YFV, o que indica seu papel como vetor secundário na manutenção e disseminação do vírus em áreas de transição entre ambientes silvestres. A ausência de *Hg. janthinomys* e a presença de *Hg. leucocelaenus*, sugerem uma possível mudança na dinâmica vetorial local, especialmente nas regiões onde a população de PNH foi severamente afetada, reforçando o papel de *Hg. leucocelaenus* como vetor primário do YFV. Dada a persistência do vírus e a presença de vetores competentes, enfatiza-se a necessidade de estratégias contínuas de vigilância entomológica e ampliação da cobertura vacinal, a fim de prevenir novos surtos na região.

Contribuição dos autores

O SFC redigiu o manuscrito e coletou as amostras de mosquitos. SFC, ANP, AAGY, ICP, JVCG e LDRP contribuíram para a geração e análise dos dados. O processamento das amostras e as análises moleculares foram realizados por SFC, AAGY, ICP, LAOK e JVCG. A identificação dos mosquitos foi realizada por LAOK, SFC e MSASN. DCL, MSASN, RRG e JSP forneceram suporte essencial com a logística do projeto. ANP e LDRP contribuíram para a preparação do manuscrito por meio da revisão crítica e atuaram como pesquisadores principais, supervisionando o desenho e a coordenação do estudo. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Agradecimentos

Agradecemos às Secretarias Municipais de Saúde de Santa Rosa de Lima, Rio Fortuna, Braço do Norte, São Martinho e Pedras Grandes pelo apoio nas coletas entomológicas. Agradecemos também ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela doação do RNA do YFV (cepa vacinal 17D), utilizado como controle positivo nos experimentos.

Referências

1. Harbach RE. Culicidae. Mosquito Taxonomic Inventory, 2025. Available online: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>.
2. Guedes, MLP. Culicidae (Diptera) no Brasil: Relações entre enfermidades, distribuição e enfermidades. *Oecol. Aust.* 2012, 16, 283–296.
3. Vasconcelos PF. Febre amarela [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(2):275-93.

4. Postler TS, Beer M, Blitvich BJ, Bukh J, de Lamballerie X, Drexler JF, et al. Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Arch Virol.* 2023; 168(9):224.
5. Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos AACD, Miranda RM, Bonelly IS, 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):218-231.
6. Forattini OP. *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia.* vol. 2. São Paulo: EDUSP; 2002. 864 pp.
7. Cardoso Jda C, de Almeida MA, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MA, Noll CA, et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(12):1918-24.
8. Moreno ES, Rocco IM, Bergo ES, Brasil RA, Siciliano MM, Suzuki A, et al. Yellow Fever Working Group. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):290-6.
9. McArthur DB. Doenças Infecciosas Emergentes. *Nurs Clin North Am.* 2019; 54(2):297-311.
10. Barrett ADT. The reemergence of yellow fever. *Science.* 2018; 361(6405):847-848.
11. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RVD, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(10):e180278.
12. Giovanetti M, Pinotti F, Zanluca C, Fonseca V, Nakase T, Koishi AC, et al. Genomic epidemiology unveils the dynamics and spatial corridor behind the Yellow Fever virus outbreak in Southern Brazil. *Sci Adv.* 2023;9(35):eadg9204.
13. Abreu FVS, Ferreira-de-Brito A, Azevedo AS, Linhares JHR, de Oliveira Santos V, Hime Miranda E, et al. Survey on Non-Human Primates and Mosquitoes Does not Provide Evidences

of Spillover/Spillback between the Urban and Sylvatic Cycles of Yellow Fever and Zika Viruses Following Severe Outbreaks in Southeast Brazil. *Viruses*. 2020. 26;12(4):364.

14. Pinheiro GG, Rocha MN, de Oliveira MA, Moreira LA, Andrade Filho JD. Detection of Yellow Fever Virus in Sylvatic Mosquitoes during Disease Outbreaks of 2017 - 2018 in Minas Gerais State, Brazil. *Insects*. 2019; 10(5):136.

15. de Oliveira CH, Andrade MS, Campos FS, da C Cardoso J, Gonçalves-Dos-Santos ME, Oliveira RS, 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(3):757.

16. Vasconcelos PF, Sperb AF, Monteiro HA, Torres MA, Sousa MR, Vasconcelos HB, et al. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97(1):60-2.

17. Da Silva DA, Pfeifer M, Pattison Z, Vibrans AC. Drivers of leaf area index variation in Brazilian Subtropical Atlantic Forests. *Forest Ecology and Management*. 2020; 476;118477.

18. Cardoso SF, Yoshikawa AAG, Pinheiro IC, Granella LW, Couto-Lima D, Neves MSAS, et al. Development and validation of RT-LAMP for detecting yellow fever virus in non-human primates samples from Brazil. *Sci Rep*. 2024; 28;14(1):22520.

19. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994. 228 pp.

20. Lane, J. Neotropical Culicidae; University of São Paulo Publisher: São Paulo, Brazil, 1953; Vol. 1.

21. QGIS Development Team, 2023. *QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation*. [Online] Available at: <https://qgis.org>. Accessed: April 30, 2025.

22. Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett*. 2006; 9(4):485-98.

23. Deus JT, Mucci LF, Lucheta Reginatto S, Pereira M, Bergo ES, de Camargo-Neves VLF. Evaluation of Methods to Collect Diurnal *Culicidae* (Diptera) at Canopy and Ground Strata, in the Atlantic Forest Biome. *Insects*. 2022; 13(2):202.
24. Wilkerson RC, Linton Y-M, Strickman D. *Mosquitoes of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore; 2021, Vol. 1 and Vol. 2, 1332 p.
25. Lira-Vieira AR, Gurgel-Gonçalves R, Moreira IM, Yoshizawa MA, Coutinho ML, Prado PS, Souza JL, Chaib AJ, Moreira JS, Castro CN. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the gallery forest of Brasília National Park, Brazil, with an emphasis on potential vectors of yellow fever. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(5):566-74.
26. Guimarães AE, Lopes CM, de Mello RP, Alencar J. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil: 1 Distribuição por hábitat. *Cad Saude Publica*. 2003; 19(4):1107-16.
27. Müller GA, Kuwabara EF, Duque JE, Navarro-Silva MA, Marcondes CB. New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) for Santa Catarina and Paraná (Brazil). *Biota Neotrop*. 2008; 8(4).
28. Goenaga S, Fabbri C, Dueñas JC, Gardenal CN, Rossi GC, Calderon G, et al. Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(11):986-93.
29. Souza RP, Petrella S, Coimbra TL, Maeda AY, Rocco IM, Bisordi I, et al. Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (diptera, culicidae) in São Paulo State, Brazil, 2009. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011; 53(3):133-9.
30. Couto-Lima D, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MA, Santos FBD, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep*. 2017; 7(1):4848.

31. Cardoso SF, Pinheiro IC, Kikuti LAO, Yoshikawa AAG, Pitaluga AN, Rona LDP. Expanded range of *Haemagogus leucocelaenus* in yellow fever hotspots: new findings from Santa Catarina State, southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2025; 120: e240240.
32. Wilk-da-Silva R, Mucci LF, Ceretti-Junior W, Duarte AMRC, Marrelli MT, Medeiros-Sousa AR. Influence of landscape composition and configuration on the richness and abundance of potential sylvatic yellow fever vectors in a remnant of Atlantic Forest in the city of São Paulo, Brazil. Acta Trop. 2020; 204:105385.

4 DISCUSSÃO GERAL

A presente tese abordou de maneira integrada o diagnóstico molecular da febre amarela por meio da técnica de RT-LAMP e a investigação de vetores silvestres envolvidos na transmissão do vírus no estado de Santa Catarina. Estruturada em três artigos científicos, a pesquisa produziu resultados complementares que avançam o conhecimento em diferentes dimensões da vigilância da doença: a) desenvolvimento e validação de um método diagnóstico rápido e acessível (Capítulo I), b) registro inédito da ocorrência de *Hg. leucocelaenus* no Sul do estado (Capítulo II), e c) caracterização da fauna de culicídeos local, incluindo o primeiro relato de infecção natural pelo YFV em *Sa. albiprivus* no Sul do Brasil (Capítulo III). Quando analisados em conjunto, esses achados evidenciam a necessidade de estratégias de vigilância mais descentralizadas, com forte ênfase em diagnóstico acessível, imunização preventiva e integração entre saúde humana, animal e ambiental, sob a perspectiva de Saúde Única.

Um dos principais avanços desta tese foi a validação da técnica de RT-LAMP para o diagnóstico do vírus da febre amarela em amostras de PNH (Cardoso *et al.*, 2024). A padronização realizada demonstrou alta sensibilidade e especificidade, comparável à RT-PCR, mas com vantagens logísticas significativas: menor custo, rapidez na obtenção dos resultados e independência de equipamentos sofisticados de ciclagem térmica. Esses atributos tornam a RT-LAMP, particularmente, adequada para aplicação em contextos de vigilância descentralizada, permitindo maior capilaridade das ações de saúde pública.

Estudos anteriores já haviam demonstrado o potencial de LAMP para diagnóstico de diferentes patógenos virais, incluindo o YFV (Kwallah *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2015). Entretanto, esses ensaios apresentavam limitações significativas, notadamente o uso exclusivo da cepa vacinal 17D na padronização, bem como a ausência de validação em amostras provenientes de campo. A presente tese, superou essas restrições ao validar o ensaio em amostras provenientes de epizootias de PNH, conferindo representatividade epidemiológica ao método e reforçando sua aplicabilidade em situações reais de vigilância.

A utilização de RT-LAMP como teste de triagem, pode reduzir substancialmente o tempo entre a suspeita clínica ou epizoótica e a confirmação laboratorial, fator crucial para o desencadeamento oportuno de medidas de controle, como bloqueios vacinais e intensificação da vigilância entomológica. Considerando que a RT-PCR, padrão ouro atual, é limitada por custos e infraestrutura (Diego *et al.*, 2021), a incorporação da RT-LAMP em laboratórios regionais ou mesmo em condições de campo, representa um avanço significativo para a saúde

pública, alinhando-se às recomendações de descentralização diagnóstica propostas por órgãos internacionais (PAHO, 2020; WHO, 2019.).

Durante o período de estudo, não foram registrados casos humanos autóctones de febre amarela, na microrregião investigada no Sul de Santa Catarina, apesar da comprovação de circulação viral em PNH e em mosquitos vetores silvestres. Esse achado é relevante por demonstrar que a circulação do vírus não necessariamente resulta em surtos humanos, desde que medidas preventivas estejam adequadamente implementadas.

A ausência de casos humanos pode ser atribuída a diferentes fatores. Em primeiro lugar, a manutenção de elevada cobertura vacinal em áreas de risco, provavelmente, desempenhou papel central, criando uma barreira imunológica eficaz contra a disseminação do vírus entre humanos (Brasil, 2018; PAHO, 2020). Em segundo lugar, a vigilância ativa de epizootias em PNH atuou como sistema sentinela eficiente, permitindo a detecção precoce da circulação viral e a implementação de respostas rápidas (Almeida *et al.*, 2011; Brasil, 2014). Não obstante, deve-se considerar a possibilidade de subnotificação de casos leves ou assintomáticos em humanos, já que a doença pode apresentar espectro clínico variado e inespecífico nas fases iniciais (Monath; Vasconcelos, 2015).

A detecção do YFV em *Sa. albiprivus*, relatada pela primeira vez no Sul do Brasil, nesta tese, reforça que a região permanece sob risco potencial, mesmo na ausência de casos humanos recentes. Esse resultado, evidencia a importância da vigilância entomológica contínua, como componente essencial para compreender a ecologia local do YFV e orientar políticas de saúde pública.

A vacina contra a febre amarela, disponível desde 1937, permanece como a ferramenta mais eficaz para prevenir surtos da doença (Monath; Vasconcelos, 2015). Entretanto, a ocorrência da maior epidemia registrada nas últimas oito décadas, entre 2016 e 2018, demonstrou que falhas na cobertura vacinal ainda representam um desafio crítico para o Brasil (Oliveira *et al.*, 2023; Possas *et al.*, 2018). Nesse período, milhares de casos foram registrados, com elevada letalidade, sobretudo em áreas até então consideradas livres da circulação viral, como a Mata Atlântica Sudeste.

No contexto de Santa Catarina, a chegada do vírus após 2019, expôs lacunas na cobertura vacinal de determinadas populações, o que favoreceu a ocorrência de epizootias em PNH e aumentou o risco de infecção em humanos (DIVE, 2025). A presente tese reforça que a manutenção de coberturas vacinais superiores a 95%, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde, é imprescindível para garantir proteção coletiva (PAHO, 2020; WHO, 2019). A vacinação preventiva, portanto, deve ser entendida não apenas como uma medida

individual, mas como um pilar de saúde pública, capaz de interromper cadeias de transmissão e evitar a expansão geográfica do vírus.

Além disso, a análise conjunta dos capítulos II e III da tese, evidencia que a diversidade e abundância de vetores silvestres na região ampliam o risco de manutenção da circulação viral. Tal cenário reforça que falhas vacinais em populações humanas suscetíveis poderiam resultar rapidamente em novos surtos, caso o vírus seja introduzido em áreas de maior densidade demográfica.

A febre amarela constitui um exemplo emblemático da necessidade de adotar a perspectiva de Saúde Única. A dinâmica epidemiológica da doença envolve múltiplos componentes interdependentes: PNH atuam como hospedeiros amplificadores, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* como vetores, e humanos como hospedeiros acidentais (Abreu *et al.*, 2019; Souza-Neto *et al.*, 2019). Dessa forma, estratégias de vigilância que considerem isoladamente apenas a saúde humana são insuficientes.

Os resultados desta tese demonstram a relevância de integrar três dimensões complementares: a) saúde animal, por meio da vigilância de epizootias de PNH, que funcionam como sentinelas sensíveis de circulação viral; b) saúde entomológica, com a caracterização da fauna vetorial e a identificação de espécies naturalmente infectadas, fundamentais para compreender o risco epidemiológico local; c) saúde humana, assegurada pela manutenção da cobertura vacinal e pela detecção laboratorial rápida de novos casos suspeitos.

Essa abordagem integrada permite não apenas compreender a complexidade dos ciclos de transmissão, mas também orientar de forma mais precisa e eficiente as políticas públicas de prevenção e controle. Como defendem Possas *et al.* (2018), apenas uma estratégia intersetorial e transdisciplinar pode responder adequadamente aos desafios impostos pelas arboviroses emergentes.

5 CONCLUSÃO

Em conjunto, os três capítulos desta tese fornecem uma visão abrangente e integrada da situação da febre amarela no Sul do Brasil. O Capítulo I contribuiu com a validação de uma ferramenta diagnóstica inovadora e acessível, o Capítulo II ampliou o conhecimento sobre a distribuição de *Hg. leucocelaenus* na região, e o Capítulo III identificou, de forma inédita, a infecção natural de *Sa. albiprivus* pelo YFV no sul do país, além do registro completo da fauna local. Esses achados, além de preencherem lacunas científicas relevantes, possuem implicações diretas para a formulação de políticas públicas em vigilância e controle da febre amarela.

A integração entre diagnóstico rápido, cobertura vacinal e vigilância entomológica, sob a ótica da Saúde Única, configura-se como o caminho mais promissor para enfrentar os riscos associados à reemergência da doença. Em especial, a RT-LAMP desponta como ferramenta de grande potencial para fortalecer a vigilância laboratorial descentralizada, possibilitando respostas mais ágeis e eficazes em contextos de risco epidemiológico.

Os resultados aqui apresentados reforçam que a febre amarela, apesar de vacinas eficazes estarem disponíveis há décadas, continua a representar ameaça significativa para a saúde pública. A consolidação de estratégias inovadoras e integradas, como as propostas nesta tese, é fundamental para prevenir novos surtos, proteger populações humanas vulneráveis e preservar a biodiversidade afetada pela circulação viral.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. V. S. *et al.* Survey on Non-Human Primates and Mosquitoes Does not Provide Evidences of Spillover/Spillback betwee. **Viruses**, Switzerland, v. 12, n. 4, p. 364, 26 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v12040364>. Acesso em: 19 jul. 2021.
- ABREU, F. V. S. *et al.* Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016 2018. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 218-231, 1 jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>. Acesso em: 01 fev. 2021.
- ALMEIDA, M. A. B. *et al.* Yellow fever outbreak affecting Alouatta populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. **American Journal Of Primatology**, v. 74, n. 1, p. 68-76, 21 out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ajp.21010>. Acesso em: 04 maio 2024.
- BERSOT, M. I. L. *et al.* Biological and behavioral features and colonization of the sylvatic mosquito Sabethes identicus (Diptera: Culicidae). **Plos One**, v. 18, n. 12, p. 1-15, 21 dez. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0296289>. Acesso em: 28 out. 2025.
- BONALDO, M. C. *et al.* Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 6, p. 447-451, jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170134>. Acesso em: 07 fev. 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Febre amarela: guia para profissionais de saúde**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 67 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 100 p.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994. 228 p.
- COUTO-LIMA, D. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 7 jul. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- CRUZ, A. C. R. *et al.* The Importance of Entomo-Virological Investigation of Yellow Fever Virus to Strengthen Surveillance in Brazil. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, v. 8, n. 6, p. 1-12, 20 jun. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed8060329>. Acesso em: 09 jul. 2025.
- DELATORRE, Edson *et al.* Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 1-

12, 24 maio 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01079>. Acesso em: 28 set. 2025.

DEUS, J. T. *et al.* Evaluation of Methods to Collect Diurnal Culicidae (Diptera) at Canopy and Ground Strata, in the Atlantic Forest Biome. **Insects**, v. 13, n. 2, p. 2-14, 16 fev. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/insects13020202>. Acesso em: 13 abr. 2025.

DIEGO, J. G. *et al.* A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. **Diagnostics**, Switzerland, v. 11, n. 3, p. 438, 4 mar. 2021. [Http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11030438](http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11030438). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11030438>. Acesso em: 02 fev. 2024.

DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. **SITUAÇÃO DA FEBRE AMARELA EM SANTA CATARINA**. Florianópolis, 2021.

DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. **SITUAÇÃO DA FEBRE AMARELA EM SANTA CATARINA**. Florianópolis, 2025.

ESCADAFAL, C. *et al.* Rapid Molecular Assays for the Detection of Yellow Fever Virus in Low-Resource Settings. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 6 mar. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002730>. Acesso em: 27 fev. 2024.

FARIA, N. R. C. *et al.* Sequencing of Yellow Fever Virus. **Methods In Molecular Biology**, Estados Unidos, p. 117-139, 2025. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-4458-4_11. Acesso em: 11 ago. 2025.

FERREIRA-DE-FREITAS, V. *et al.* Contribution to the Biodiversity Assessment of Mosquitoes (Diptera: culicidae) in the atlantic forest in santa catarina, brazil. **Journal Of Medical Entomology**, p. 1-9, 23 dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjw196>. Acesso em: 15 jul. 2025.

FRANCO, Odair. História da febre-amarela no Brasil. Brasil, **Ministério da saúde**, Departamento Nacional de Endemias Rurais, 1969. 208 p.

GUIMARÃES, A. E. *et al.* [Mosquito (Diptera, Culicidae) ecology in the Iguazu National Park, Brazil: 1 Habitat distribution]. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1107-1116, ago. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2003000400032>. Acesso em: 20 abr. 2025.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica: Identificação, biologia e epidemiologia**, v. 2, São Paulo: EDUSP, 2002. 864 p.

GOENAGA, S. *et al.* Isolation of Yellow Fever Virus from Mosquitoes in Misiones Province, Argentina. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 11, p. 986-993, nov. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0730>. Acesso em: 17 mar. 2025.

HARBACH, R. E. Culicidae. Mosquito Taxonomic Inventory. 2025. Available from: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>.

KWALLAH, A. O. *et al.* A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. **Journal Of Virological Methods**, v. 193, n. 1, p. 23-27, out. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.004>. Acesso em: 17 jan. 2024.

LI, S. L. *et al.* Mapping environmental suitability of *Haemagogus* and *Sabethes* spp. mosquitoes to understand sylvatic transmission risk of yellow fever virus in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-21, 7 jan. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0010019>. Acesso em: 27 mar. 2025.

MCARTHUR, D. B. Emerging Infectious Diseases. **Nursing Clinics of North America**, v. 54, n. 2, p. 297–311, jun. 2019.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, Pedro F.C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160-173, mar. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>. Acesso em: 12 jul. 2021.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, n. 2, p. 62-69, 2009. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>. Acesso em: 01 jul. 2020.

MÜLLER, G. A. *et al.* New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) for Santa Catarina and Paraná (Brazil). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 4, p. 211-218, dez. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-06032008000400021>. Acesso em: 10 abr. 2025.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63-63, 15 jun. 2000. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>. Acesso em: 01 jul. 2020.

NUNES, M. R.T. *et al.* Analysis of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for yellow fever diagnostic. **Journal of Virological Methods**, v. 226, p. 40-51, dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.10.003>. Acesso em: 15 jul. 2021.

OLIVEIRA, C. H. de *et al.* Yellow Fever Virus Maintained by *Sabethes* Mosquitoes during the Dry Season in Cerrado, a Semiarid Region of Brazil, in 2021. **Viruses**, Switzerland, v. 15, n. 3, p. 757, 15 mar. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v15030757>. Acesso em: 13 fev. 2024.

PAHO. Pan American Health Organization. **Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection**. 2018. Washington. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/laboratory-diagnosis-yellow-fever-virus-infection-2018>. Acesso em: 18 jul. 2025.

PAHO. Pan American Health Organization. **Yellow fever**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/yellow-fever>. Acesso em: 20 jun. 2025.

PINHEIRO, G. G. *et al.* Detection of Yellow Fever Virus in Sylvatic Mosquitoes during Disease Outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais State, Brazil. **Insects**, v. 10, n. 5, p. 136-

148, 10 maio 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/insects10050136>. Acesso em: 20 dez. 2023.

POSSAS, C. *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 10, p. 1-10, 3 set. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180278>. Acesso em: 05 out. 2023.

POSTLER, T. S. *et al.* Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. **Archives of Virology**, v. 168, n. 9, 10 ago. 2023.

SOROKA, M.; WASOWICZ, B.; RYMASZEWSKA, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? **Cells**, Switzerland, v. 10, n. 8, p. 1931-1951, 29 jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10081931>. Acesso em: 10 jun. 2025.

SOUZA, R. P. de *et al.* Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (diptera, culicidae) in São Paulo State, Brazil, 2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 3, p. 133-139, jun. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652011000300004>. Acesso em: 10 dez. 2024.

TELLES-DE-DEUS, J. *et al.* COI DNA barcoding to differentiate *Haemagogus janthinomys* and *Haemagogus capricornii* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 259, p. 107377-1, nov. 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107377>. Acesso em: 28 set. 2025.

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

VASCONCELOS, P. F.C. *et al.* Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 97, n. 1, p. 60-62, jan. 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(03\)90023-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(03)90023-x). Acesso em: 22 fev. 2025.

APÊNDICE A – GALERIA DE FOTOS

Prancha 1: Realização de palestras e atividades de capacitação voltadas aos profissionais de saúde dos municípios pertencentes à área de abrangência da Gerência Regional de Saúde de Tubarão, no Sul do Estado de Santa Catarina, com o objetivo de sensibilizar e qualificar esses profissionais para atuarem como agentes multiplicadores junto à comunidade. As ações visaram promover a notificação imediata de epizootias em primatas não humanos, a implementação oportuna do bloqueio vacinal e a adoção de condutas adequadas diante de casos suspeitos de febre amarela.



Prancha 2: Identificação de epizootias em primatas não humanos nos municípios da região Sul de Santa Catarina, associados à circulação viral do vírus da febre amarela.



Prancha 3: Realização de exame clínico em bugios em campo e coleta de vísceras provenientes de epizootias suspeitas de febre amarela, na região Sul de Santa Catarina, para fins diagnósticos.



Prancha 4: Coleta de mosquitos realizada por meio da técnica de Atração Humana Protegida e esclarecida, conduzida na copa e no solo de ecossistemas em municípios do Sul de Santa Catarina.



Prancha 5: Mosquitos capturados ainda vivos em tubo coletor e triagem sob superfície fria no laboratório para identificação taxonômica.

