

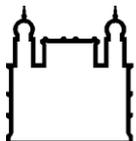
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero *Aedes*

Dinair Couto Lima

Rio de Janeiro
Junho/2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Dinair Couto Lima

Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero *Aedes*.

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biologia Parasitária.

Orientadores:

Prof Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira & Prof^a Dra. Flávia Barreto dos Santos

**Rio de Janeiro
Junho de 2017**

Couto-Lima, Dinair .

Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero Aedes / Dinair Couto-Lima. - Rio de Janeiro, 2017.

XI,113 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

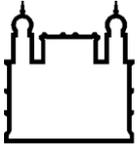
Orientador: Ricardo Lourenço de Oliveira.

Co-orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

Bibliografia: f. 94-107

1. Febre Amarela. 2. Competência Vetorial. 3. Gênero Aedes. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Dinair Couto Lima

Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero *Aedes*.

ORIENTADORES:

Prof.Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira & Prof^a. Dra. Flávia Barreto dos Santos

Aprovado em: 14/06/2017

EXAMINADORES

Prof^a. Dra. Myrna Cristina Bonaldo-Presidente (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Pedro Luiz Tauil (Universidade de Brasília –UNB, Brasília/, DF)

Prof. Dr. José Bento Pereira Lima (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Jerônimo Augusto Fonseca de Alencar (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Melo Neto (Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 14 de junho de 2017

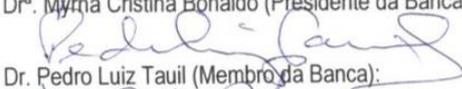


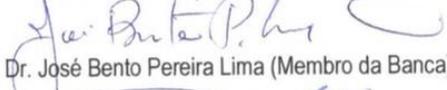
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Dinair Couto Lima**, sob orientação do Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira e coorientada pela Dr^a. Flávia Barreto dos Santos. Ao décimo quarto dia do mês de junho de dois mil e dezessete, realizou-se às nove horas e trinta minutos, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Risco da reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero Aedes”** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Pedro Luiz Tauil - UNB/Brasília-DF, Dr. José Bento Pereira Lima - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar – IOC/FIOCRUZ e Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto-UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAM da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 14 de junho de 2017.


Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo (Presidente da Banca):


Dr. Pedro Luiz Tauil (Membro da Banca):


Dr. José Bento Pereira Lima (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários Instituto Oswaldo Cruz (LATHEMA), Fundação Oswaldo Cruz, e no Laboratório Unité Arboviruses et Insect Vectore (UAIV), Instituto Pasteur-Paris, França. Com recursos da Fundação Oswaldo Cruz, e CAPES COFECUB.

AGRADECIMENTO

O ato de agradecer vem quando refletimos que sozinhos não podemos realizar nada, que em algum momento se precisa de alguém, porque a autossuficiência não é um dom e sim um egoísmo de pensar que somos. Nada cresce sozinho e muito menos ninguém. Sempre teremos que buscar no outro um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão e uma atitude de amor para prosseguir uma jornada superando muitos obstáculos e arestas.

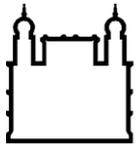
A todos aqueles que de diferentes formas colaboraram para realização deste trabalho, expresse minha profunda gratidão e respeito.

“O conhecimento do passado contribui para melhor entender o presente e avaliar com maior precisão a evolução para o futuro”

Hermann Schatzmayr

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A febre amarela- Aspectos Gerais	1
1.1.1 Aspectos Históricos da Febre Amarela no Mundo e no Brasil	4
1.1.2 O Vírus FA e os Arbovírus	17
1.1.3 O Vírus da Febre Amarela	19
1.1.4 Ciclos de transmissão e aspectos epidemiológicos	23
1.1.5 VETORES	32
1.1.6 Vetores da febre amarela na África	33
1.1.7 Vetor Urbano	35
1.1.8 Vetores silvestres no Brasil	39
1.1.9 <i>Haemagogus (Conospostegus) leucocelaenus</i>	40
1.1.10 <i>Sabethes albiprivus</i>	44
1.1.11 Competência Vetorial	46
1.2 JUSTIFICATIVA	49
2. OBJETIVOS	53
2.1 Objetivo geral	53
2.2 Objetivos específicos	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 Comitê de ética	54
3.2 Mosquitos	54
3.3 Vírus	58
3.4 Experimentos	58
4. RESULTADOS	61
4.1 Disseminação e transmissão do YFV em mosquitos do gênero <i>Aedes</i>	63
4.2 Susceptibilidade de <i>Aedes aegypti</i> das Américas aos genótipos Sul americano I e Oeste Africano do YFV	65
4.3 Eficiência de <i>Aedes albopictus</i> de áreas brasileiras densamente povoadas, como o Rio de Janeiro, para transmitir experimentalmente o vírus da febre amarela	70
4.4 Susceptibilidade de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> provenientes de um país africano endêmico de febre amarela – Congo – às cepas Americana e Africana do YFV	74
4.5 Competência de mosquitos silvestres – <i>Haemagogus</i> e <i>Sabethes</i> – da população do Rio de Janeiro para transmitir as cepas brasileiras e africana do vírus da febre amarela	76
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8. ANEXOS	108



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

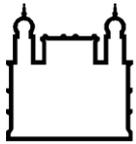
Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por população competente de mosquitos do gênero *Aedes*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Dinair Couto Lima

O vírus da febre amarela (YFV), transmitido pela picada de mosquitos vetores infectados, pode causar uma doença viral mortal. No Brasil, o YFV é restrito a um ciclo silvestre mantido entre primatas não-humanos (PNH) e mosquitos acrodentofílicos e, os seres humanos podem ser infectados acidentalmente ao penetrarem ou se aproximarem de ambientes naturais, especialmente durante epizootias em PNH. Desde novembro de 2016, números crescentes de casos humanos de febre amarela foram relatados no sudeste do Brasil, atingindo a costa Atlântica, uma das áreas mais povoadas da América do Sul, como o Estado do Rio de Janeiro, onde habitam cerca de 16 milhões de pessoas. Este estudo visou determinar a competência vetorial de dez populações naturais Sul Americanas (Brasil) e Africanas (Congo e Gabão) de mosquitos urbanos, *Aedes (Stg.) aegypti* e *Ae. (Stg.) albopictus*, e mosquitos silvestres, *Haemagogus (Con.) leucocelaenus* e *Sabethes (Sab.) albiprivus*, de áreas endêmicas, epidêmica/epizoótica e até recentemente livres de febre amarela, para três cepas do YFV: duas representantes dos genótipos Sul Americano I, uma da linhagem circulante até 2001 (1D) e outra circulante desde 2004 (1E), e do genótipo Oeste Africano. As taxas de infecção, disseminação e transmissão das cepas virais nas populações em questão foram determinadas aos 3^o, 7^o, 14^o e 21^o dpi. Infecção foi observada somente a partir do 7^o dpi; disseminação foi observada a partir do 7^o dpi e transmissão geralmente do 14^o dpi em diante, a despeito da população examinada e cepa viral. Por isso, as análises foram feitas considerando os dados obtidos aos 14^o e 21^o dpi. Com poucas exceções, a cepa de YFV recentemente isolada (1E) foi mais eficiente em infectar *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus*. Além disso, foi demonstrado que YFV disseminou do intestino médio para os tecidos secundários (cabeça) em todas as espécies de mosquito até 21 dpi, independentemente da cepa viral testada. Mosquitos *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* de áreas endêmicas, epizoótica e livre de YFV do Brasil e do Congo, foram experimentalmente competentes para transmitir as duas cepas brasileiras e a cepa africana do vírus, a partir do 14 dpi, com vantagens para a última espécie. *Ae. aegypti*, mas também *Ae. albopictus* do Rio de Janeiro demonstraram alta susceptibilidade aos YFV testados e altas taxas de transmissão, mais altas que suas populações da área enzoótica brasileira. Os mosquitos silvestres *Hg. leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus* do Rio de Janeiro foram altamente suscetíveis às cepas dos genótipos Sul Americano I e do Oeste Africano. Portanto, é grande o risco de ressurgimento de epidemias de febre amarela urbana no Brasil, em especial



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Potential risk re-emergence of urban transmission of yellow fever vírus in Brazil facilitated by competente *Aedes* populations

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

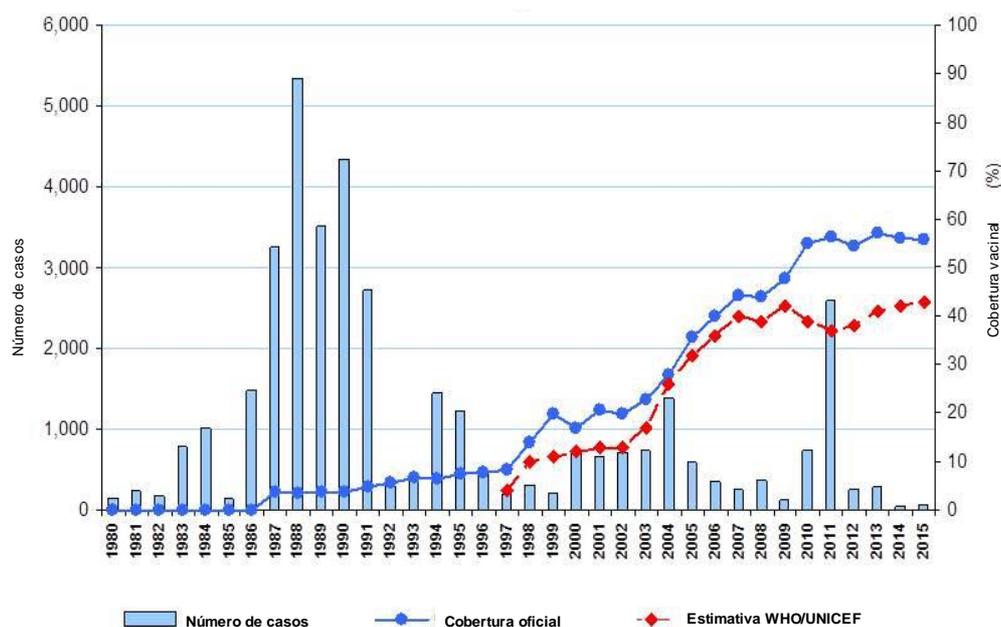
Dinair Couto Lima

The yellow fever virus (YFV), transmitted by the bite of mosquitoes infected vectors, can cause a deadly viral disease. In Brazil, YFV is restricted to a wild cycle kept among non-human primates (HNP) and mosquitoes. Humans can be infected accidentally when penetrating or getting close to natural environments, especially during epizootic diseases in HNP. Since November 2016, increasing numbers of human cases of yellow fever were reported in southeast Brazil, reaching the Atlantic coast, one of the more populated areas of South America, such as the State of Rio de Janeiro, where about 16 million of people inhabit. This study aimed to determine the vector competence of ten natural urban mosquito populations (*Aedes*(*Stg.*) and *Aedes* (*Stg.*) *albopictus*) and wild mosquitoes (*Haemagogus* (*Con.*) *leucocelaenus* and *Sabethes* (*Sab.*) *albiprivus*) from South American (Brazil) and Africa (Congo and Gabon) endemic, epidemic/epizootic and until recently free of yellow fever areas, for three strains of YFV: two representatives of the South American Genotype I (strains I D and 1E) and West African Genotype. The infection, dissemination and transmission rates of the viral strains analyzed were determined at 3, 7, 14 and 21 dpi. Infection was observed only from 7 dpi and dissemination was observed from the 7th dpi and on and transmission usually at 14 dpi, regardless of the population examined and viral strain.

Therefore, the analysis was preformed considering the data obtained at 14 and 21 dpi. With few exceptions, the strain of YFV recently isolated (1E) was more efficient in infecting *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Hg. leucocelaenus*. In addition, it was demonstrated that disseminated YFV for secondary tissues (head) in all species of mosquito at 21 dpi, regardless of viral strain tested. *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes from endemic areas, YFV-free epizootic-Brazil and the Congo, were experimentally competent to transmit the two Brazilian YFV strains and the African YFV strain, from the 14 dpi and on, with advantages for the latter species. *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* from Rio de Janeiro have shown high susceptibility and transmission rates to the YFV strains tested. The wild *Hg. leucocelaenus* and *Sabethes albiprivus* mosquitoes from Rio de Janeiro were highly susceptible to the South American Genotype I and West African strains. Therefore, the risk of resurgence of epidemics of urban yellow fever in Brazil is real.

20%, mas quando a assistência médica local não é adequada, a letalidade pode chegar a 50%. O diagnóstico diferencial clínico com outras arboviroses e várias outras doenças é difícil e, por isso, o número de casos notificados na África, em particular, é certamente muito subestimado. A grande maioria dos casos ocorre em áreas próximas a floresta e em áreas rurais.

Como detalharemos mais tarde, a infecção teve provável origem no continente africano, tendo se dispersado pelo mundo juntamente com seu mosquito vetor clássico urbano, o *Aedes (Stegomyia) aegypti*, conhecido até hoje na literatura científica como *the yellow fever mosquito*. A febre amarela já foi considerada um dos maiores flagelos da humanidade nos séculos XVIII a XIX, causando epidemias devastadoras em aglomerados urbanos, especialmente em cidades portuárias. Sua transmissão vetorial foi descoberta na primeira década do século XX, com os estudos coordenados por Walter Reed em Cuba, em 1900-1901, que conseguiu controlar a transmissão a partir do controle e vigilância do mosquito vetor. Baseados nestes resultados, no Brasil, Oswaldo Cruz e Emílio Ribas também enfrentaram epidemias com o combate ao vetor. Mas, ainda nas primeiras décadas daquele século, a febre amarela causou epidemias urbanas de grandes proporções e prejudicou o avanço de grandes projetos de desenvolvimento, como a construção do Canal do Panamá.



Source: WHO/IVB database, 2016
 194 WHO Member States.
 Data as of 15 July 2016



Figura 2. Número anual de casos de febre amarela no mundo e a cobertura vicinal, entre 1980 e 2015. Fonte: WHO (http://www.who.int/immunization/monitoring-surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/yellow_fever/en/).

Nas últimas décadas, alguns surtos ocorreram em áreas urbanas de países endêmicos na África e, com algumas exceções, têm sido relativamente controladas por campanhas de vacinação. Contudo, o número de casos de febre amarela aumentou, devido à diminuição da cobertura vacinal, especialmente por conta da falta de sustentabilidade dos programas de vacinação e dificuldade de acesso a áreas rurais onde se dá a maiorias das epidemias, aos desmatamentos, à urbanização caótica, aos movimentos de população, à pobreza, a guerras civis e às mudanças climáticas (Bryant *et al* 2007).

A epidemia de 2015-2016 de febre amarela ocorrida em Angola consiste num importante exemplo da ameaça representada pelo ressurgimento desse vírus em áreas com baixa cobertura vacinal em região endêmica. Com efeito, essa epidemia

de febre amarela urbana resultou em 4.000 casos suspeitos e aproximadamente 400 mortes em apenas seis meses, a partir de dezembro de 2015. A epidemia angolana rapidamente atingiu o país vizinho da República Democrática do Congo. Além disso, e bastante alarmante, foi o fato de indivíduos virêmicos que partiram da África e se dispersaram para várias zonas densamente povoadas e infestados por mosquitos do subgênero *Stegomyia* dentro e fora da África, como a China, por exemplo (Woodal e Yulli 2016).

1.1.1 Aspectos históricos da Febre Amarela no Mundo e no Brasil

Diferentes de outras enfermidades, a febre amarela nunca teve destaque na história antiga da humanidade, nem no famoso livro de epidemias de Hipócrates, e muito menos era conhecida entre os povos antigos. Só depois de sua descrição na América, foi que passou a ser citada. Um dos primeiros relatos de uma doença cujo os sintomas mais tarde foram comparados aos da febre amarela foi feito pela civilização Maia, em 1648, que registraram a existência de uma grave enfermidade que denominavam “**XEKIK**”, que significava “*vômito de sangue*” (Bustamante, 1958).

A expansão do vírus amarílico pelo mundo teve provável início durante uma longa batalha denominada *Veja-Real*, ocorrida em ilhas espanholas, hoje Haiti, durante a segunda expedição de Cristóvão Colombo, em 1495, aliado aos espanhóis contra os indígenas. Após serem derrotados, mais de cem mil portugueses e espanhóis se refugiaram em abrigos e esconderijos nas florestas e nas montanhas. Aproximadamente, dois meses depois do ocorrido, surgiu uma epidemia, tanto do lado dos europeus quanto entre os indígenas, que ocasionou numerosas vítimas. Os sintomas dessa enfermidade foram relatados de forma incompleta. Porém, havia elevada letalidade. Esse detalhe somado a outros descritos e as circunstâncias

epidemiológicas levaram Bérrarfer-Féraud a concluir “que se pode admitir, sem hesitar, que este flagelo terrível se trata da Febre Amarela”. (Bérrarfer-Féraud, 1890). Se verdadeira a hipótese, a forma silvestre da doença acabava de se revelar, cujos nativos chamavam de “*Pouliccatina*”, que significava “*coup de barre*” (golpe de barra), nome dado pelos franceses à doença. Tratava-se de uma doença epidêmica no Novo Mundo, sem nenhuma semelhança com outras enfermidades descrita até então na Europa.

Em 1635, o Jesuíta Raymond Bréton foi o primeiro a registrar, com mais precisão, a ocorrência de uma epidemia entre os imigrantes franceses da Ilha de Guadalupe, destacando novamente a presença do vômito negro entre os sintomas, já descrito pelos Maias, além da febre alta, outros sinais e sintomas, como icterícia e dores lombares. Além disso, relatava que a morte acontecia do terceiro ou quinto dia após o início das manifestações clínicas. Uma outra observação relevante feita por Bréton foi a relação entre a ocorrência da epidemia e a derrubada de árvores. Fez o seguinte registro: “A medida que cortavam os bosques, a terra arrojava seu veneno”, (Franco, 1969a e 1969b).

História da febre amarela no continente americano, segundo os relatos de europeus, como Bréton e Du Tertre, teve relevante avanço com descrição mais detalhada de epidemias no século XVII. As suas observações ressaltavam as formas silvestres da moléstia na América. Entretanto, várias teorias foram propostas sobre a origem da enfermidade. Assim, em 1686, admitiu-se que a febre amarela pudesse ter sua origem no continente africano, tanto que as colônias francesas foram instruídas a tomarem medidas sanitárias drásticas a fim de evitar e conter a infecção amarílica procedente da África. Uma delas foi reduzir as expedições ao continente africano.

Uma vez que as descrições mais ricas sobre a doença febre amarela na América foram relativamente tardias, concluiu-se que já havia tempo suficiente para

que o vírus já tivesse migrado da África para o Novo Mundo. Foi Henry Carter o primeiro a acreditar que o vírus era originário da África e que era transmitido por um inseto. O fato é que a doença, embora realmente fosse originária da África, só veio a ser conhecida depois de descrita na América. Segundo Carter, o desconhecimento da doença no continente africano seria justificado por uma série de argumentos, tais como: “o número reduzido de expedições europeias à África, a pequena colônia europeia lá existente, a falta de crônicas daquele tempo, e a hipótese de uma doença que se acreditava ser benigna, potencialmente explicada por um longo contato de muitas gerações africanas com o agente etiológico”. De fato, a sua grande contribuição foi cogitar que um inseto pudesse transmitir a moléstia; um mosquito seria transmissor da infecção, fazendo analogia a malária, que poderia ser confundida com a infecção amarílica.

As teorias da origem africana da febre amarela seriam confirmadas posteriormente, especialmente a partir de estudos moleculares e filogenéticos de isolados virais. Mas faltavam subsídios para definir como a doença se disseminava.

Epidemias de febre amarela atingiram repetidamente os Estados Unidos e outros países do continente americanos nos séculos XVIII e XIX, ainda que já tenha chegado a Nova York, em 1668, onde pelo menos 20 epidemias ocorreram nos meses de verão dos anos subsequentes (Brès 1986, Patterson 1996). Nos USA, as epidemias foram importadas por navios vindos do Caribe, que registravam grandes epidemias (Patterson 1992). Antes de 1822, a febre amarela atacava cidades norte-americanas muito distantes tão ao norte quanto Boston e Filadélfia. Mas após 1822, passou a ser restrita ao sul dos USA. As cidades portuárias eram os alvos principais, mas a doença ocasionalmente se espalhava para o interior, especialmente pelo rio Mississippi. As epidemias da febre amarela causaram perdas econômicas e terror: aproximadamente 100.000-150.000 mortes ocorreram especialmente entre imigrantes

brancos recém-chegados às cidades portuárias do sul. Já os brancos e negros locais desfrutavam de uma resistência considerável (Patterson 1992).

Entre as epidemias mais devastadoras do continente americano nos séculos XVII e XIX, podemos citar a perda 20 mil dos 27 mil homens britânicos durante um ataque a Cartagena, Colômbia, que sofria uma epidemia em 1741, e de 8.000 em 15.000 britânicos, em Cuba, em 1762, enquanto o exército francês perdeu 25 mil homens em Santo Domingo, em 1803 (Brès, 1986). A febre amarela dizimava frequentemente as tripulações de navios e populações civis em vários portos. A primeira tentativa de cavar o canal do Panamá, em 1880-88, falhou após 52 mil casos de febre amarela e malária entre os 85 000 trabalhadores, causando grande atraso no projeto (Brès, 1986).

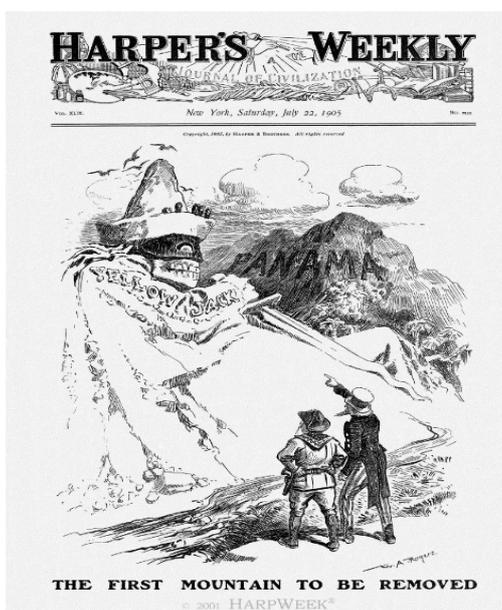


Figura 3. Capa do jornal Herper's Weekly, do dia 22 de julho de 1909, contendo ilustração feita por Wiilliam A Rogers representando caricaturalmente o obstáculo que a febre amarela representou para o avanço da abertura do Canal do Panamá, no início do século XX. Fonte: <http://www.nytimes.com/learning/general/onthisday/harp/0722.html#explanation>.

Na África, a primeira epidemia de febre amarela registrada com segurança dizimou as tropas inglesas, no Senegal, em 1778. Novos focos ocorreram nos portos da costa oeste do Senegal, no Noroeste, até Angola, no sul. Na Europa, alguns casos eram detectados ocasionalmente durante o verão, em portos franceses que negociavam com a América. A febre amarela também atingiu a Espanha, até 1830, com um total de 100 mil vítimas. Um surto em Lisboa, em 1857, causou 1800 casos, um terço dos quais morreu (Brès 1986).

No século XX, após o início do uso de uma vacina desenvolvida a partir da cepa Asibi (Stokes *et al*, 1928), foi cultivada até 58 passagens em cultivo celular de embrião de galinha por até 114 passagens seriadas do isolado do YFV africano em embrião de galinha (vírus 17D) (Loyd *et al*, 1936). Theiler e Smith (1937a), demonstraram uma redução viral visceral e neurotropismo, quando inoculados intracerebralmente em macacos. Este vírus foi replicado ainda por 227 e 229 passagens, após atenuado foi usado em soro humano imune para teste de imunização em 8 voluntários humanos (Theiler & Smith 1937b). Os resultados foram satisfatórios, demonstraram ausência de reações adversas e também a soroconversão para YFV em duas semanas, resultando em maior escala de imunização, sendo realizada no Brasil (Soper 1937, Smith *et al*. 1938) A combinação com programas de controle ou erradicação do vetor clássico urbano, o *Ae. aegypti*, houve grande redução do território de ocorrência da febre amarela no mundo. Apesar disso, uma série de epidemias foram registradas nos países da faixa central e equatorial africana (Figura 4), entre as décadas de 1980 e 2010 (Garske *et al* (2014).

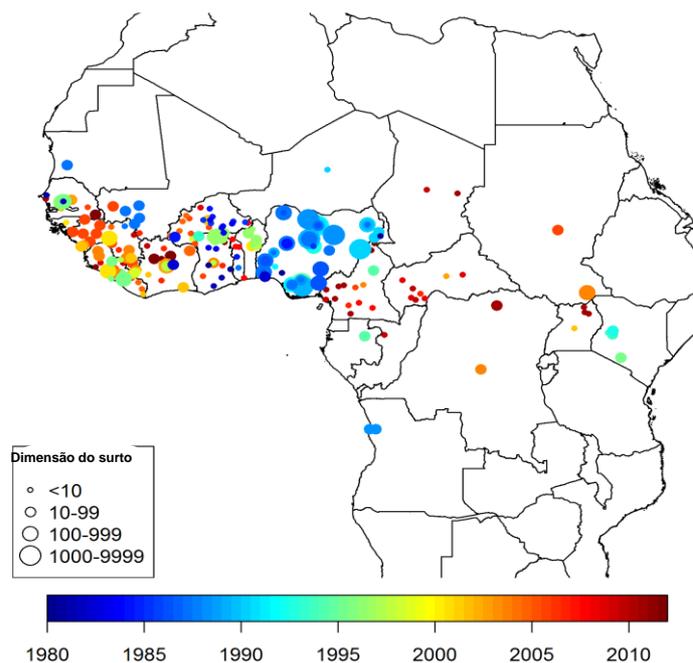


Figura 4. Distribuição das epidemias de febre amarela na África, entre 1980 e 2010. Fonte: Garske *et al* (2014).

No Brasil, os primeiros relatos da circulação do vírus amarílico datam do século XVII, no estado de Pernambuco. Assim, as primeiras vítimas dessa enfermidade seriam da primeira epidemia que ocorreu em 1685, em Recife, que durou por 7 anos. Durante muito tempo, a doença ficou conhecida como “Mal de Sião”, devido à procedência do barco do Golfo do Sião (Ásia). Contudo, a associação do nome da moléstia a essa embarcação não é exata, pois a nau chegou ao Recife em 1690, isto é, cinco anos após a primeira epidemia. Entretanto, a doença permaneceu durante muito tempo conhecida desta forma, embora a febre amarela no Sião fosse desconhecida, pois até a atualidade não há relatos da ocorrência de febre amarela nos países asiáticos. Porém, tal como descrito acima para outros países do continente americano, as epidemias de febre amarela atingiam especialmente cidades portuárias, aqui representado pelo Recife.

Contudo, ainda permaneciam muitas dúvidas sobre a transmissão da doença. O médico João Ferreira da Rosa, recém-chegado em Recife, vindo da corte Portuguesa, autorizado por Dom Pedro II a exercer seus conhecimentos e experiência médica sobre a febre amarela adquiridos na Europa, iniciou o combate da doença e o tratamento dos enfermos naquela cidade. Em suas investigações, e conhecendo a teoria de Carter sobre a transmissão vetorial da febre amarela, Ferreira da Rosa recomendava medidas sanitária, tais como acender fogueiras, fazer defumação das casas, limpeza das ruas. Em 1691, Ferreira da Rosa declarou: “*Em Pernambuco, há sete anos assiste-se uma grave doença, a qual nunca jamais nele se viu*”. Significa que se tratava de algo novo, indícios de ser de fato a primeira epidemia de que se tem registros no Brasil.

Ao longo dos anos, cada vez mais se afirmava a suposição de que a infecção amarílica tenha sido importada para o Brasil, trazida por embarcações, como o caso do Recife supracitado. Havia a hipótese da procedência africana. O Governador de Pernambuco na época, Marquês de Montebelo, recomendou todas as prudências com as pessoas acometidas com males em terra ou a bordo, para que esta doença não se perpetuasse entre os habitantes, para que “ não se constituíssem as povoações do Recife e Olinda um São Tomé”, referindo-se às condições epidemiológicas naquele país africano. Porém, o francês Barbot, que esteve na ilha de São Tomé, entre 1684 e 1686, descreveu as doenças que grassavam na ilha, fortalecendo a teoria de que a febre amarela poderia ter procedência tanto na África quanto no continente Americano, (Franco, 1969a).

No século XIX, já no segundo Império, a doença já havia se propagado do norte ao sul do Brasil, embora a sua propagação não foi contínua (Franco 1969a). Ela atingiu primeiramente os portos marítimos, seguindo, geralmente, as rotas marítimas. Por exemplo, em dezembro de 1849, um navio francês (denominado *Alcyon*) chegou

ao Recife procedente da Bahia, no qual dois homens teriam morrido durante a travessia e um ainda enfermo foi recolhido a um hospital. Porém, quando diagnosticado se tratar de caso de febre-amarela, transportaram-no de volta para o barco. Mas, outros casos já tinham sido diagnosticados entre as tripulações dos navios ancorados no mesmo porto e, em seguida, a epidemia se disseminou, causando 2.800 mortes. No mesmo dezembro de 1849, a febre amarela foi diagnosticada na cidade Rio de Janeiro após a chegada da barca “Navarre”, também procedente da Bahia, e da capital logo chegou a Niterói e Campos, por exemplo, causando o que seria a primeira epidemia fluminense e carioca de fato documentada. Alguns autores acreditam que a doença já existia no Rio de Janeiro antes dessa epidemia. (Franco 1969a).

Na cidade do Rio de Janeiro, o foco inicial seria uma hospedaria na rua da Misericórdia, perto da área portuária da Praça XV, onde se alojaram marinheiros chegados ao Rio na barca Navarre. Os primeiros diagnósticos oficiais de febre amarela no Rio de Janeiro datam de 28 de dezembro de 1849, por Roberto Cristiano Bertoldo Lallement (Franco 1969a). Em pouco tempo, já havia se instalado um grande surto na rua da Misericórdia e no seu entorno, outras partes do centro da cidade até a Lapa, Catete, Lagoa Rodrigo de Freitas, Tijuca, Inhaúma e Irajá. A cidade, com uma população de 166.000 habitantes, era malcuidada e insalubre, foi rapidamente tomada pela febre amarela, onde permaneceu sendo transmitida por 59 anos. Obviamente, passada a onda epidêmica de 1850 a doença foi se tornando endêmica e assim permaneceu, com maior ou menor intensidade, até o verão de 1861, quando quase se extinguiu. A figura a seguir mostra a variação do número de casos que chegaram a óbito na cidade do Rio de Janeiro entre esta epidemia (1850) e o que Franco (1969a) chama de era pré-Oswaldo Cruz, ou seja, antes do cientista e sanitarista pôr em práticas medidas de controle contra o mosquito vetor, uma vez que a transmissão

vetorial havia sido recentemente descoberta.

**MORTALIDADE PELA FEBRE-AMARELA NO RIO DE JANEIRO
PERÍODO DE 1850 A 1902
(Zona Urbana)**

Ano	N.º de Óbitos	Ano	N.º de Óbitos
1850	4.160	1878	1.176
1851	475	1879	974
1852	1.943	1880	1.625
1853	853	1881	257
1854	22	1882	89
1855	3	1883	1.608
1856	101	1884	863
1857	1.868	1885	445
1858	1.545	1886	1.449
1859	500	1887	137
1860	1.249	1888	747
1861	247	1889	2.156
1862	12	1890	719
1863	7	1891	4.456
1864	5	1892	4.312
1865	—	1893	825
1866	—	1894	4.852
1867	—	1895	818
1868	3	1896	2.929
1869	272	1897	159
1870	1.118	1898	1.078
1871	8	1899	731
1872	102	1900	344
1873	3.659	1901	299
1874	829	1902	984
1875	1.292		
1876	3.476		
1877	282		
			TOTAL: 58.063

Figura 5. Número de óbitos por febre amarela na zona urbana do Rio de Janeiro, de 1850 a 1902. Fonte: Franco (1969a).

Por muitos anos, no percurso da doença, acreditou-se que a transmissão da febre amarela se fazia através dos miasmas, do desenvolvimento espontâneo da doença proveniente dos navios negreiros e até mesmo que ela brotava do solo infectando as pessoas que por ali passavam e outras teorias. Por mais absurda que fossem essas teorias foram renovadas e defendidas no século passado. Foi Josiah Clarck Nott, quem primeiro em 1848, vagamente aventurou-se na idéia que a tal moléstia poderia ser transmitida por mosquitos.

A partir dessas teorias teve início ao combate aos mosquitos, afugentando-os, originalmente feito com o uso da queima de enxofre e em seguida pela fumigação com piretro dissolvido em tetracloreto de carbono e querosene. Essas ações conseguiram reduzir o número de óbitos por febre amarela na cidade de 584, em 1903, para zero em 1909 e reduzindo o número de focos do *Aedes aegypti*. A doença retraiu, retornando epidêmica, porém, em 1928-29. A origem dos primeiros casos nunca foi determinada, havendo duas hipóteses: soldados do exército que estiveram no NE, havia transmissão mais prevalente que na capital federal, ou re-emergência a partir de caso adquirido no ambiente silvestre (proposta feita por Fred Soper, em 1938, quando já se sabia da existência desse outro ciclo de transmissão (Franco 1969a). De maio de 1928 a setembro de 1929, a epidemia atingiu 738 pessoas e causou 478 óbitos, uma letalidade de 64,8%. Segundo Franco (1969), o fim da epidemia em 17 meses deu-se graças as ações anti-vetoriais, que já incluíam o uso de adulticidas, mas também de ações intensificadas para combate às formas imaturas.

O governo brasileiro e a Fundação Rockefeller assinam colaboração para o combate à febre amarela no Brasil em 1929. Em junho de 1930, o cargo de Inspetor-Geral do Serviço de Febre-Amarela era ocupado por Fred L. Soper, substituindo M.E. Connor, que fizera as primeiras ações em 1929. Soper logo teria aumentado o quadro

de pessoal, especialmente médico, e ampliação dos serviços de controle do mosquito e, em 1931, estabeleceu o uso da prova de neutralização, permitindo o estudo da prevalência de indivíduos imunizados nos estados entre 1931 e 1935 (Franco 1969a). O estudo revelou que a prevalência em crianças autóctones (0-14 anos) variava de 0% em SP a 53,9 % em SE, passando por 12% no estado do RJ e 26,3% na capital, e em adultos de 12,5% na PB a 74,3% no RN. O RJ tinha uma prevalência de anticorpos neutralizantes em 61,3% de seus habitantes. A febre amarela urbana no Brasil estava cessando, sendo o último caso detectado no Acre, em 1942 (Franco 1969a), mas outra forma de manutenção do vírus na natureza seria descoberta.

A transmissão silvestre da febre amarela foi pela primeira vez comprovada no Brasil, nos anos 1930, em área rural do ES. Porém, alguns indícios já tinham sido obtidos no país bem antes. Adolpho Lutz já havia feito a hipótese de transmissão na mata (Lutz 1930: 130-1):

“Contra mais de uma dúzia de focos epidêmicos que pouco a pouco se estabeleceram sobre as estradas de ferro principais que ligavam São Paulo com o interior, havia somente dois que não eram servidos por estradas de ferro ou vapores fluviais. Nestes, a existência de estegomia tinha pouca probabilidade, cabendo provavelmente o papel de transmissor a mosquitos de mato mais ou menos parentes. Um dos casos, do qual tinha apenas informação, se referia a uma aldeia de índios do Rio Verde. No outro que investiguei pessoalmente, tratava-se de febre-amarela que apareceu em alguns ranchos estabelecidos no meio de uma floresta, por trabalhadores. (...) Estes cortavam o mato, em preparação para a construção de uma estrada de Ferro que devia ligar Funil a Campinas. Examinei vários ranchos donde tinham saído casos de febre-amarela, sem encontrar vestígios de larvas ou adultos de estegomia, não faltando porem mosquitos de mato. "O fato é tanto mais interessante que ultimamente foi verificada na África a transmissão por outros mosquitos diferentes da nossa estegomia caseira. Esta, entre nós, há de ter sempre o papel mais importante e a transmissão por outras espécies deve ser rara e excepcional, mas não deixa de ser um problema interessante a verificação de outras espécies que podem transmitir o vírus".

Emílio Ribas também sugeriu que uma epidemia ocorrida em 1899, no interior de São Paulo, tivesse transmissão silvestre: "*E para cúmulo, como um protesto aos teóricos que afirmavam ser a febre-amarela um mal das cidades, tivemos de combatê-lo em plena mata virgem, quando foi da abertura do núcleo colonial Campos Sales*" apud Franco 1969: 121).

Em 1930, em Santa Teresa, a 600m de altitude, no Vale do Canaã, ES, e sem a presença de *Ae. aegypti*, foram detectados casos suspeitos de febre amarela. A confirmação do diagnóstico foi feita em pacientes adoecidos em 1932. Minuciosas buscas nas casas não detectaram o vetor clássico e, sob a supervisão da Fundação Rockefeller, organizaram-se capturas de mosquito fora das casas, ainda em 1932, quando *Aedes scapularis* (Rondani) foi a espécie mais frequente, ainda *Aedes terreus* (Walker), *Aedes serratus* (Theobald), e espécies de *Psorophra* e *Mansonia* também fossem obtidas em vários dos focos de febre amarela silvestre descobertos no estado. Em 1938, comprovava-se, pela primeira vez, que *Haemagogus capricornii* Lutz e *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) eram vetores silvestres da febre amarela. Ainda em 1932, um estudo de soro-neutralização foi feito dentre 789 indígenas do AM, demonstrando parasitemia em 35,6%, revelando que a transmissão silvestre não era particularidade do Sudeste brasileiro (Franco, 1969).

O roteiro da epidemia de febre amarela silvestre no Brasil, a partir dos anos 1930 foi assim descrito por Franco (1969a):

"Em 1934, a febre-amarela silvestre apareceu na Bahia (Ilhéus), Amazonas, Pará (Ilha de Marajó), Bahia e Mato Grosso, dirigindo-se depois para o Sul e para Leste e ameaçando as regiões mais populosas do País. Em 1935, infiltrou-se nos Estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, explodindo em vários municípios, onde a viscerotomia os localizava. No ano seguinte chegou ao Paraná e depois a Santa Catarina, salpicando, ainda, as áreas por onde havia passado. Em seguida dirigiu-se para o Estado do Rio de Janeiro, onde

penetrou em 1938, e fechando o roteiro num ciclo de 7 anos, retornou em 1939, à área espírito-santense do Vale do Canaã, onde fôra descoberta em 1932". (Sic.)

O vírus da febre amarela silvestre produziu muitos casos nos 30 anos que se seguiram, na grande parte dos estados do Brasil, especialmente naqueles sob influência do cerrado e das florestas Atlântica e Amazônica, como revela o quadro produzido por Franco (1969a), mostrado na Figura 6.

CASOS DE FEBRE AMARELA SILVESTRE, NO BRASIL, CONFIRMADOS PELO LABORATÓRIO DE 1932 A 1967

UNIDADE DA FEDERAÇÃO	N.º DE CASOS	UNIDADE DA FEDERAÇÃO	N.º DE CASOS
Acre	11	Paraná	81
Amazonas	17	Piauí	1
Bahia	15	Pelo Grande do Sul	7
Espírito Santo	291	Rio de Janeiro	65
Goiás	210	Rorônia	2
Maranhão	3	Roraima	5
Mato Grosso	118	Santa Catarina	40
Minas Gerais	417	São Paulo	329
Pará	63	Total	1.078

Figura 6. Casos de Febre amarela silvestre, confirmados laboratorialmente, de 1932 a 1967 no Brasil.

A vacina da febre amarela, baseada no vírus YVF atenuado, cepa 17D foi desenvolvida em 1936 e passou a ser produzida no ano seguinte no Instituto Oswaldo Cruz. As primeiras vacinas foram aplicadas no mesmo ano no Rio de Janeiro, e, posteriormente, em massa em MG no mesmo ano. Foi também nesta década que se estrutura o programa de erradicação do *Ae. aegypti*, do Brasil e das Américas, com auxílio e supervisão técnica da Fundação Rockefeller. Foi verificado que se podia conseguir a interrupção da transmissão da febre amarela com a redução do índice de

focos larvários de *Ae. aegypti* a 5%, que foi considerado o "índice crítico", isto é (Franco 1969a). O programa foi um sucesso. Os últimos focos desse mosquito foram achados no estado da BA, em abril de 1955. Porém, com o relaxamento do programa, o mosquito re-infestou o país, provavelmente no final dos anos 1967 ou início dos anos 1970, a partir de países americanos que não cumpriram a meta da erradicação, como USA, Venezuela, as Guianas e Cuba (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

1.1.2 O vírus da Febre Amarela e os Arbovírus

O vírus da febre amarela é um arbovírus, ou seja, um vírus transmitido por artrópodes (Arbovírus, em inglês *Arthropod-borne virus*). Este conjunto de vírus são vírus cuja manutenção na natureza ocorre por meio da transmissão biológica entre animais vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos, como mosquitos, pulgas, flebotomíneos, piolhos e carrapatos (WHO 1966). Os vírus são ingeridos pelo artrópode durante repasto sanguíneo em vertebrado virêmico. Sendo susceptível, haverá replicação viral nos diferentes tecidos do artrópode, a começar pelo epitélio do estômago, até o aparecimento de partículas virais infectantes na sua saliva. Assim, através da picada, as partículas virais são inoculadas juntamente com a saliva, no vaso sanguíneo ou no interstício cutâneo dos vertebrados durante a hematofagia. O período decorrido da ingestão do sangue virêmico pelos artrópodes e a infecção das glândulas salivares é denominado de período de incubação extrínseco.

Outras formas de um arbovírus se disseminar é através das vias de transmissão vertical e venérea. Entretanto, a ocorrência desse fenômeno na natureza, ou seja, transmissão de partículas virais das fêmeas grávidas infectadas para a sua prole ou durante a cópula, parece ser de 1 a 5%, que para alguns autores seria insuficiente

para a manutenção dos arbovírus na natureza. (Fine 1975; Thompson e Beaty 1977; Gubler e Kuno 1997). Todavia, esses fenômenos podem contribuir muito para a sobrevivência e manutenção da transmissão dos vírus nos períodos em que as condições de encontro entre vetor infectado e hospedeiro vertebrado susceptível é raro ou nulo, denominado de períodos interepidêmicos (quando grande parte da população de vertebrados amplificadores do vírus já está imune), ou épocas de redução das populações citadas (vetores e hospedeiros vertebrados).

Atualmente, existem mais de 500 arbovírus descritos (Centers for Disease Control and Prevention 2016), e estão mundialmente distribuídos sendo presentes em todos os continentes. Os arbovírus pertencem a alguns gêneros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* (Hanley e Weaver 2008). Os arbovírus podem infectar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo mamíferos, aves, anfíbios e répteis, assim como artrópodes das ordens Anoplura, Diptera, Hemiptera, Siphonaptera (insetos) e Ixodida (carrapatos) (Kuno e Chang 2005). A maioria dos arbovírus existe apenas nos ambientes silvestres, circulando entre animais e artrópodes silvestres, onde o homem pode representar um hospedeiro acidental (Figura 7) (Weaver e Reisen, 2010). Portanto, as arboviroses são classificadas comumente como zoonoses, ou seja, infecções causadas por patógenos transmitidos entre animais e o homem (WHO, 2006). Em alguns casos, bem exemplificados pelos vírus Dengue (DENV), Febre Amarela, Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV), houve emergência de ciclos rurais e urbanos, nos quais a transmissão não depende mais de animais silvestres como amplificadores e fontes de infecção para artrópodes, passando os humanos a desempenhar este papel (Figura 7).

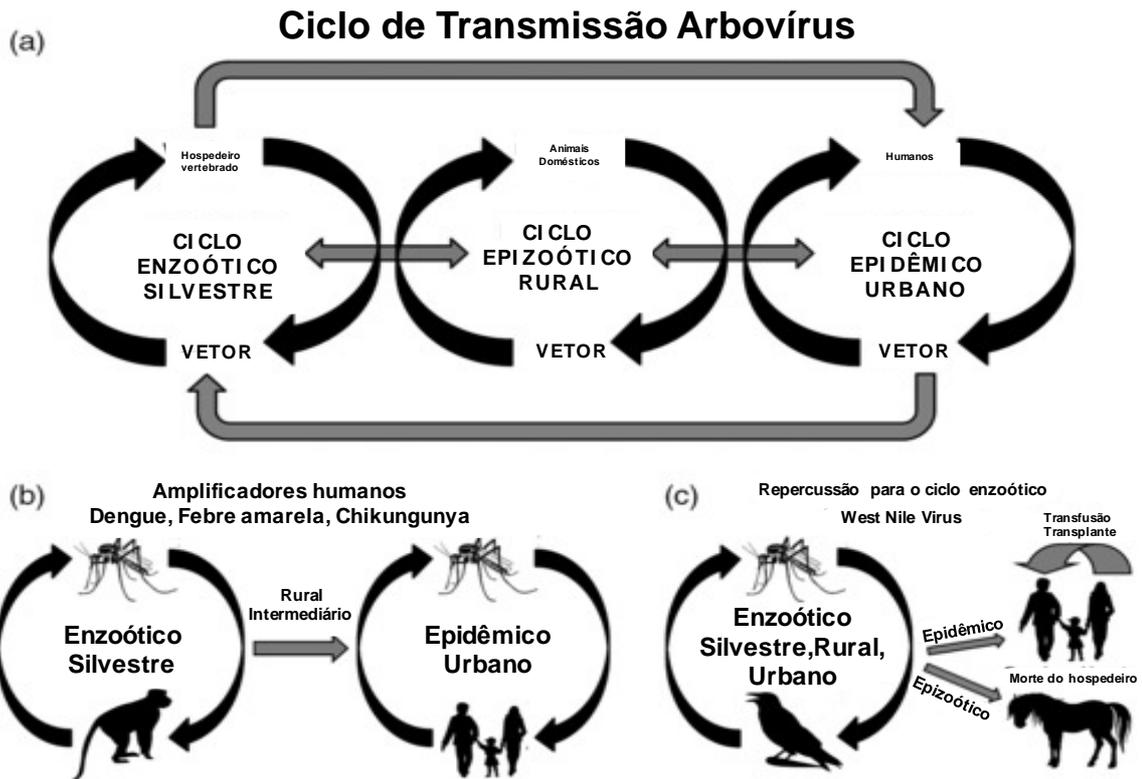


Figura 7. Representação esquemáticas de possíveis ciclos de transmissão vetorial de arbovírus. Fonte: Anez *et al.* (2012).

Nesses casos, ciclos de transmissão em ambiente urbano ou suburbano se estabelecem, sendo mantidos entre humanos e vetores com hábitos antropofílicos e normalmente domésticos (Weaver e Reisen, 2010). Dessa forma, atualmente várias arbovirose estão emergindo como importantes problemas globais de saúde pública, cujos agentes etiológicos são transmitidos principalmente por mosquitos antropofílicos dos gêneros *Aedes* e *Culex* (Diptera: Culicidae).

1.1.3 O Vírus da Febre Amarela

O agente etiológico é o vírus da febre amarela (YFV), protótipo do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). Trata-se de um vírus de RNA de fita simples, de senso-positivo, cujo genoma completo cerca de 11 mil nucleotídeos, que codificam 3.411 aminoácidos.

importado para a costa leste americana a partir da costa da África Ocidental durante o comércio de escravos que, sem dúvida, favoreceu a dispersão do vírus e do mosquito africano e seu vetor urbano clássico, o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Bryant *et al.*, 2007, Staples & Monath 2010).

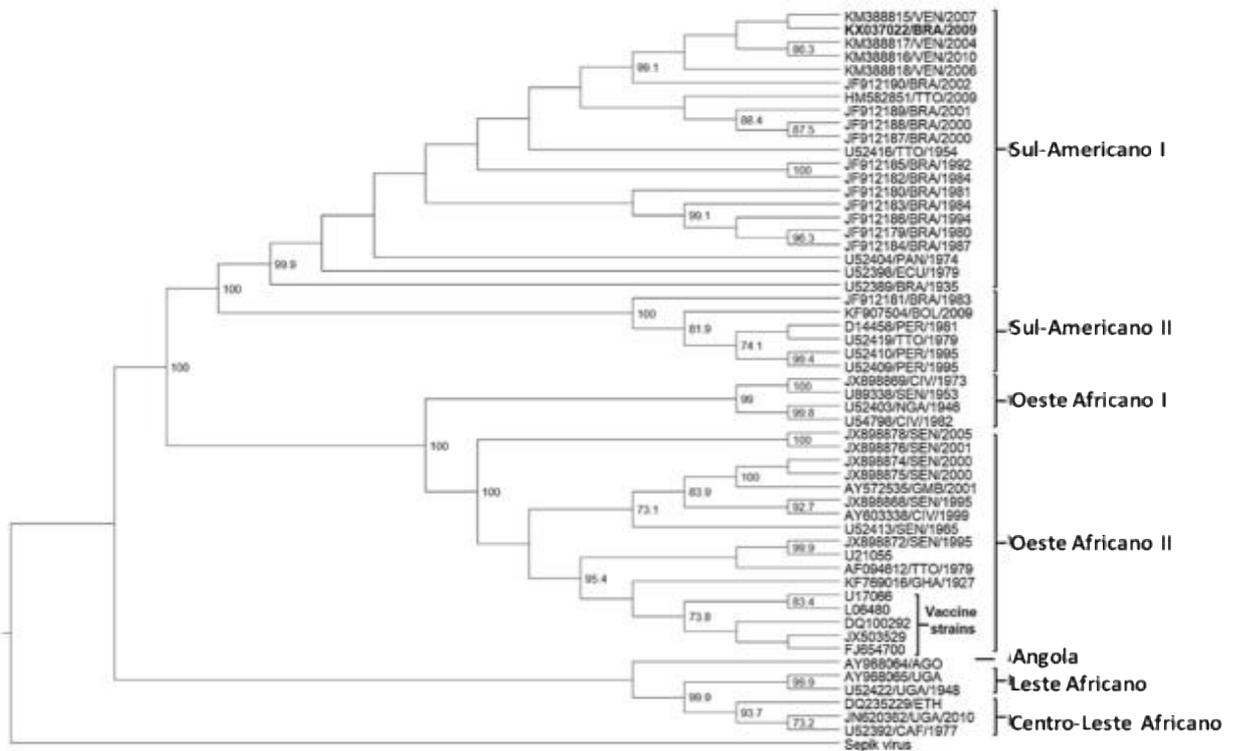


Figura 9. Filogenia do vírus da febre amarela, com ênfase no relacionamento entre os genótipos sul-americanos e os Africanos. Fonte: Bryant *et al.* (2010).

O genótipo do YFV identificado mais frequentemente no Brasil é o Sul-americano I (Vasconcelos *et al.* 2004, Nunes *et al.* 2012). Análises filogenéticas de isolados de YFV do Brasil obtidos aproximadamente nos últimos 70 anos tem identificado distintas linhagens, denominadas 1A a 1E, que se sucedem no tempo e espaço (Figura 9) (Vasconcelos *et al.* 2004). A linhagem do vírus pertencente ao genótipo Sul Americano I denominada 1D foi responsável por epizootias e casos humanos de 1998 a 2001. Ela foi substituída por uma nova linhagem viral, chamada 1E, que causou morte maciça de bugios (*Alouatta caraya*) e casos humano no Sul do Brasil, em áreas consideradas livres de febre amarela há décadas (de Souza *et al.* 2010). Análises moleculares recentes revelaram a existência de polimorfismos no

genoma do vírus circulante no Sudeste do Brasil durante a epidemia de 2016-2017, sugerindo a provável existência de uma sub-linhagem emergida na linhagem 1E (Bonaldo *et al* 2017).

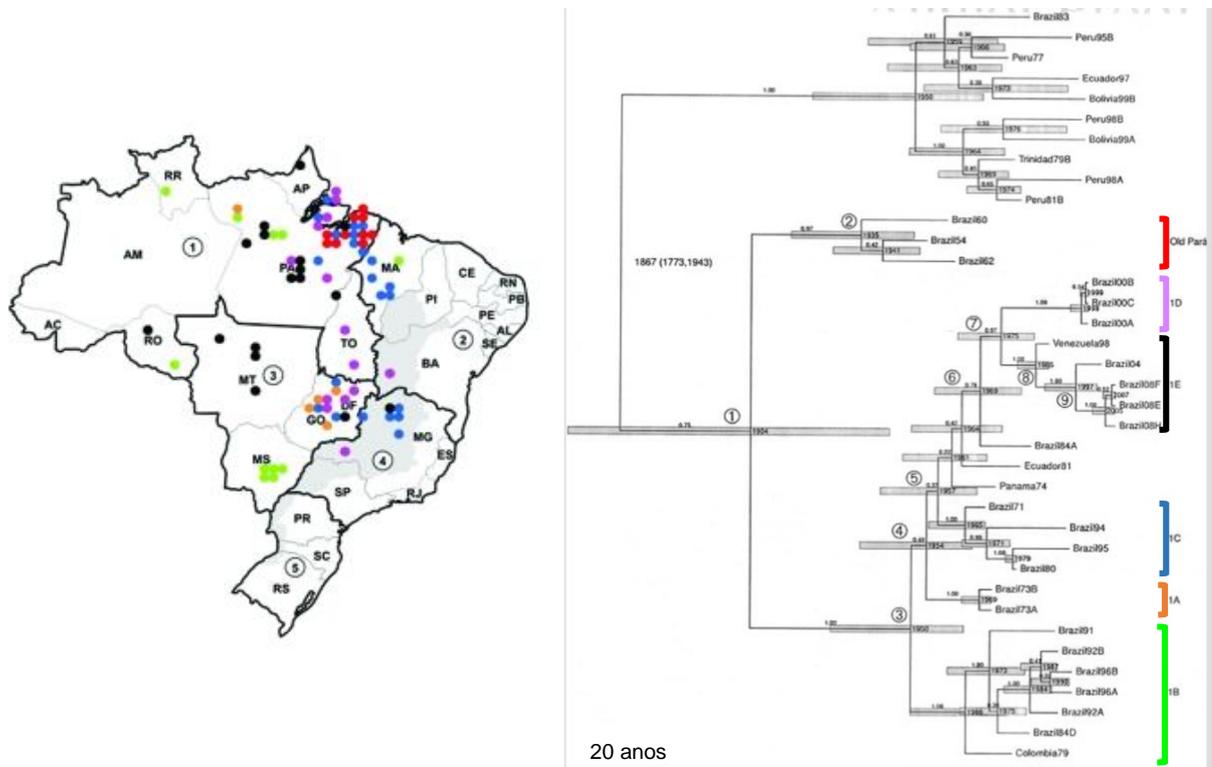


Figura 10. Filogenia do vírus da febre amarela baseada em análise de sequências de 576 nucleotídeos da região NS5/3'NCR do genoma viral. Fonte: Vasconcelos *et al* (2004).

1.1.4 Ciclos de transmissão e aspectos epidemiológicos

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda com dois tipos principais ciclos de transmissão, que têm características epidemiológicas distintas: o ciclo silvestre e o ciclo urbano (Figura 11). No ciclo silvestre, o vírus é transmitido entre os primatas não-humanos, os hospedeiros vertebrados amplificadores primários do YFV, pela picada de mosquitos acrodendrófilos, ou seja, seus hábitos alimentares e reprodutivos se dão

nas copas das árvores. Durante as epizootias nas florestas, os humanos podem se infectar acidentalmente, nas franjas de florestas ou entrando na mata, ao serem picados por mosquitos infectados.

Na África, o vírus pode apresentar um terceiro ciclo, denominado rural ou de emergência, onde mosquitos ecléticos, que circulam tanto no ambiente natural quanto modificado, podem picar humanos e infectá-los. É dessas áreas de emergência africanas que surgem surtos que chegam ao ambiente urbano naquele continente. Neste último, o vetor *Ae aegypti* assume a transmissão independente da presença de outros vetores e de macacos amplificadores (Figura 11). No Brasil, desde o início do uso da vacina a eliminação do *Ae. aegypti*, não houve mais transmissão urbana da febre amarela. Assim, desde a década de 1940, no Brasil e restante da América do Sul, salvo raras exceções (Van der Stuyft *et al* 1999, PAHO 2008), a febre amarela acha-se restrita à transmissão silvestre nas florestas tropicais. (Staples & Monath 2008, Monath & Vasconcelos 2015).

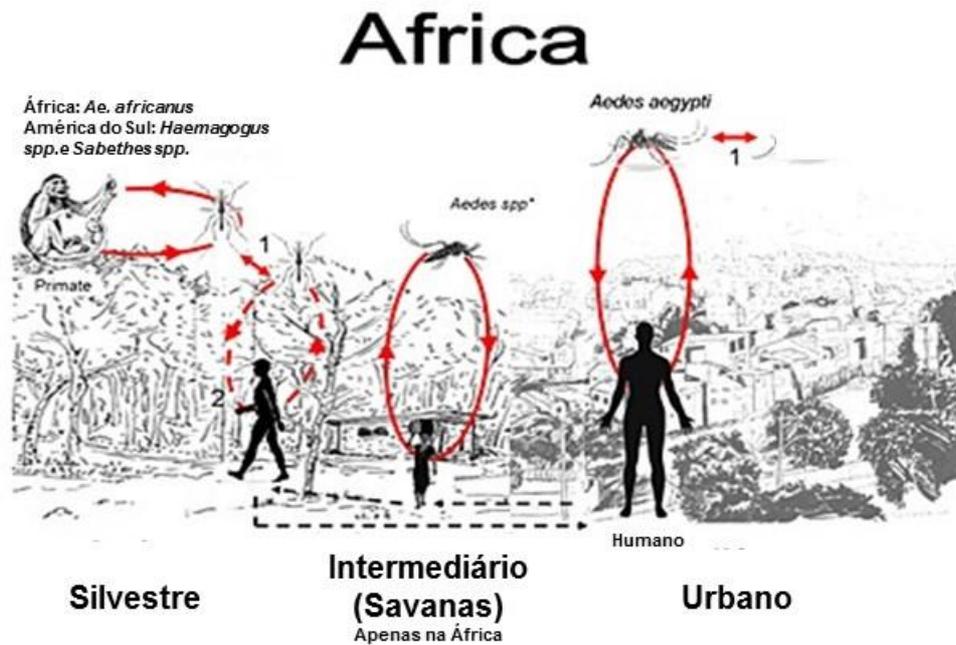


Figura 11. Representação esquemática de três possíveis ciclos de transmissão vetorial do vírus da febre amarela.

No Brasil, ciclo silvestre da febre amarela é mantido por mosquitos dos gêneros *Hemagogus* e *Sabethes*, tendo como principal fonte de infecção primatas não humanos (PNHs), particularmente macacos dos gêneros *Allouata*, *Cebus* e *Atelles*, mas também saguis, gênero *Callithrix*. Os seres humanos não imunes podem acidentalmente se infectarem, penetrando ou se aproximando de áreas enzoóticas. De acordo com a situação fitogeográfica, diferentes espécies de PNHs e mosquitos podem estar envolvidos na transmissão da FA e terem distintos papéis epidemiológicos (Degallier *et al*, 1992).

Os PNHs são os principais hospedeiros amplificadores do vírus, de modo que um primata susceptível, em período de viremia, pode servir como fonte de infecção para vários mosquitos. Contudo, tem-se observado diferenças consideráveis tanto em relação à susceptibilidade e letalidade quanto ao papel como amplificador e reservatório viral dos diferentes gêneros de PNHs neotropicais. Assim, os “macacos-

prego” (*Cebus*) se infectam facilmente, mas apresentam baixas taxas de letalidade, adquirindo, na maioria das vezes, imunidade. O vírus da febre amarela já foi isolado em indivíduos dessa espécie (Vasconcelos *et al*, 2001; Bensabath *et al.*, 1966) e, dependendo da região, os *Cebus* são os mais frequentemente implicados na transmissão e respondem experimentalmente à inoculação do vírus com viremia de dois a seis dias, demonstrando a possibilidade de constituir fonte de repasto considerável para mosquitos, o que sugere o papel “amplificador” desse gênero de primatas (Hervé *et al.*, 1985).

Na Guiana Francesa, foram avaliadas 140 amostras (sangue e soro) de três espécies de primatas de vida livre: *Alouatta seniculus*, *Pithecia pithecia* e *Saguinus midas*. Anticorpos específicos na reação de inibição de hemaglutinação foram detectados para: febre amarela, Mayaro, dengue 2 e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) (De Thoisy *et al*, 2001). No Sul e Sudeste do Brasil, são os bugios ou guaribas, macacos do gênero *Alouatta*, os mais acometidos nas epizootias (Mascheretti *et al* 2014).

Todos os gêneros de primatas do Novo Mundo são susceptíveis ao vírus da febre amarela e podem, portanto, atuar como hospedeiros deste arbovírus, pois são basicamente arborícolas e habitam o mesmo estrato arbóreo que as principais espécies de mosquitos vetoras. Os gêneros que mais têm sido associados com a ocorrência de epizootias no Brasil são *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix*. (MS-SVS, 2005)

O perfil epidemiológico da FA silvestre no Brasil vem mudando, influenciado pelos padrões de migração, expansão urbana, deslocamento de pessoas não vacinadas para atividades turísticas em áreas de transmissão de FA e a fatores climáticos (Romano *et al* 2014, Mascheretti *et al* 2014).

Nas últimas décadas, observou-se uma tendência ascendente do número de casos registrados de FA silvestre e crescente expansão do vírus em direção as áreas

indenes. Com efeito, desde o final da década de 1990, a febre amarela tem ampliado a sua distribuição, atingindo as regiões Sul e sudeste do Brasil (Figura 12), aproximando-se das cidades mais densamente povoadas e altamente infestadas por mosquitos do subgênero *Stegomyia* (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) (Carvalho *et al* 2014) e coincidentemente onde há baixa cobertura vacinal por se tratarem historicamente de regiões sem circulação do vírus por muitas décadas (Massad *et al* 2001, Romano *et al* 2014).

A gravidade e extensão territorial dos surtos de FA ocorridos no país a partir do ano 2000 impuseram a aplicação de ações emergenciais de controle com o objetivo de limitar a circulação do vírus (Romano *et al* 2014). Mas, apesar das medidas adotadas observou-se que a transmissão extrapolou as áreas tradicionalmente consideradas como de risco, atingindo o RS, MG e SP (Vasconcelos 2003). Há nítida expansão para leste, aproximando-se do RJ, estado em que, no passado, houve circulação viral no ambiente silvestre como já descrevemos (Soper 1942, Franco 1969a).

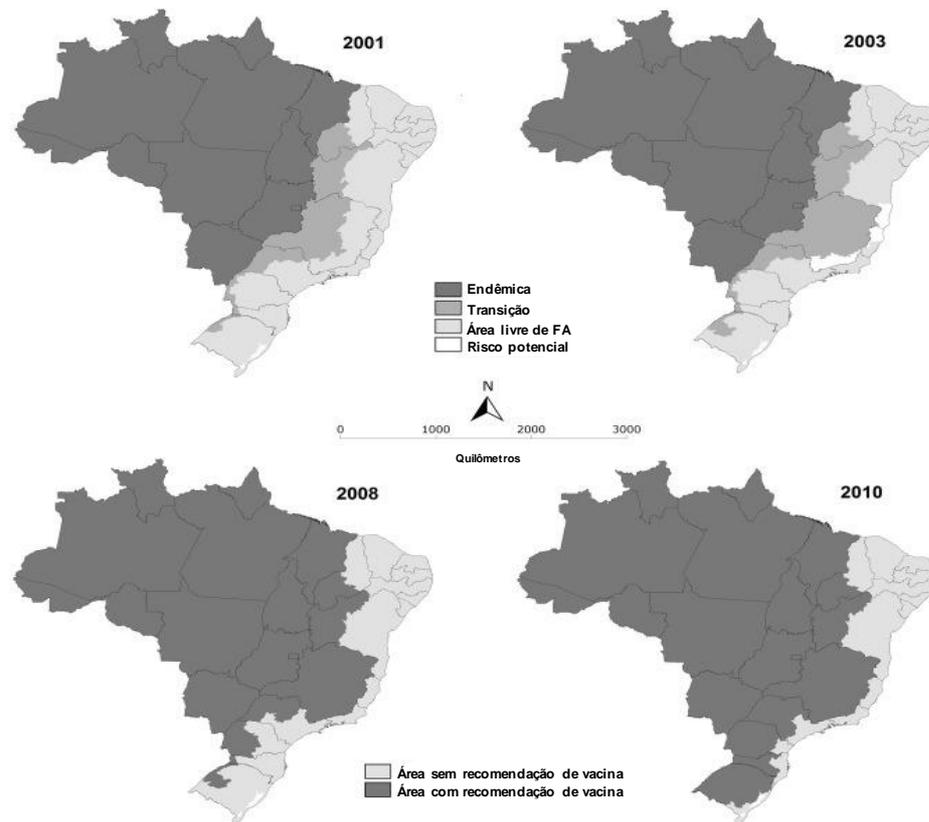


Figura 12. Evolução geográfica do risco de transmissão de febre amarela no Brasil, de 2001 a 2010. Fonte: Romano *et al.* (2014).

Acredita-se que a Amazônia seja um grande foco enzoótico de febre amarela, onde se originam epizootias em macacos que se disseminam em direção ao Centro-Oeste e, em seguida, ao Sul e Sudeste. Essa disseminação territorial geralmente gera epizootias e surtos em humanos a cada 6-7 anos principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e a cada 14 anos em média, na Amazônia (Figura 13) (Monath & Vasconcelos 2015). O roteiro principal de espalhamento seriam as matas de galeria, ligando bacias hidrográficas da Amazônia com aquelas do Brasil central, subsequentemente, aquelas do Sul e Sudeste. Em vista da velocidade com que epizootias ou epidemias se espalham no continente Sul-americano e em com base em estudos moleculares e genéticos do YFV, tem se proposto também que o comércio

ilegal de PNH e a movimentação rápida de humanos podem assumir algum papel na disseminação espacial. Nesse aspecto em particular, duas teorias sobre evolução viral, com aparecimento de linhagens e substituição das mesmas por novas linhagens do YFV e emergência de epidemias no continente (Vasconcelos *et al* 2004, Vasconcelos 2010, Auguste *et al* 2010, 2015).

Nas matas de galeria, principal corredor para o vírus, e nas matas residuais, o vetor principal tem sido o *Hg. janthinomys*, embora outras espécies muito frequentes e antropofílicas possam estar envolvidas mas cujo papel na transmissão é ainda parcialmente conhecido (Vasconcelos *et al.* 2001; 2003; Camargo-Neves *et al.* 2005). Durante estas ondas de espalhamento territorial da febre amarela no país, o encontro de PNHs mortos é um dos principais sinais de alerta da ocorrência deste fenômeno.

Epizootia é considerada pela vigilância um importante evento sentinela para o potencial de circulação do vírus da febre amarela silvestre entre PNS e casos humanos são, na maioria das vezes, precedidos por epizootias (Almeida *et al.* 2012, 2014). Assim, a vigilância de epizootias tem contribuído para a identificação da circulação viral em dada área antes que populações humanas sejam atingidas, indicando ou não a necessidade de realização de medidas profiláticas urgentes, como a vacinação anti-amarílica em massa. Por exemplo, observou-se que, no período de 2007 -2009, foram notificadas 1971 epizootias envolvendo PNHs, sendo 73 no ano de 2007, 1.050 em 2008 e 848 em 2009 (Araújo *et al.*, 2011). Estas informações foram fundamentais para o aperfeiçoamento da vigilância e a consolidação da notificação de epizootias em primatas, como instrumento de prevenção de casos humanos da doença.

Romano *et al.* (2011) cita as principais recomendações para vigilância, prevenção e controle para febre amarela no Brasil, principalmente a vigilância de epizootias como ferramenta de grande importância para o serviço de saúde. Por outro

lado, alguns estudos têm demonstrado que mesmo em situações em que não há registro de macacos doentes ou mortos, a evidência de circulação do vírus em populações de PNH pode ser detectada com base na presença de anticorpos específicos para o vírus febre amarela e/ou no isolamento do vírus dos PNH e dos mosquitos vetores.

A última grande onda epidêmica de febre amarela se iniciou em 1998 e perdurou essencialmente até 2003, porém outros picos epidêmicos foram observados em 2008 e 2009, seguido de um período de circulação mais baixa, ainda que em vários momentos a taxa de letalidade foi bastante elevada, como pode ser verificado na ilustração abaixo (Figura 13).

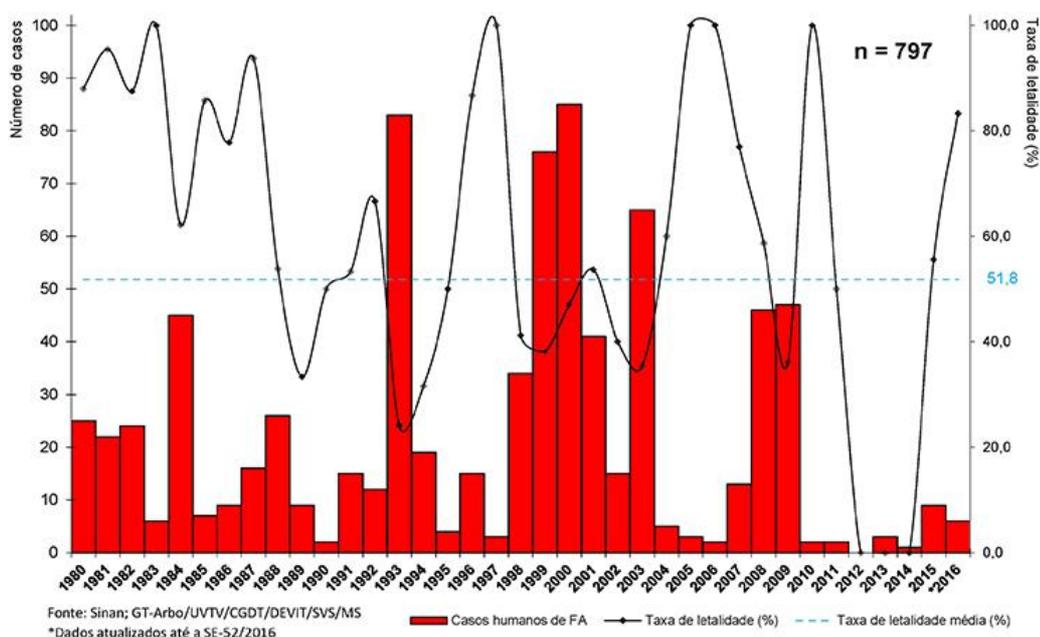


Figura 13. Série histórica do número de casos humanos confirmados de febre amarela silvestre e a letalidade no Brasil, 1980 a 2016. Fonte: Ministério da Saúde (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>).

Em finais de 2016, uma epidemia iniciada provavelmente em Minas Gerais, resultou num aumento rápido da incidência, em especial no centro e nordeste deste estado, e também no ES, e também em SP e RJ, como discutiremos mais tarde

(<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febreamare-la>). Por conta disso, a área com indicação para a febre amarela cresceu consideravelmente, sendo que, até maio de 2017, há recomendação de vacinação permanente em 3.768 municípios brasileiros, dos quais em 239 a recomendação é ainda temporária (Figura 14).

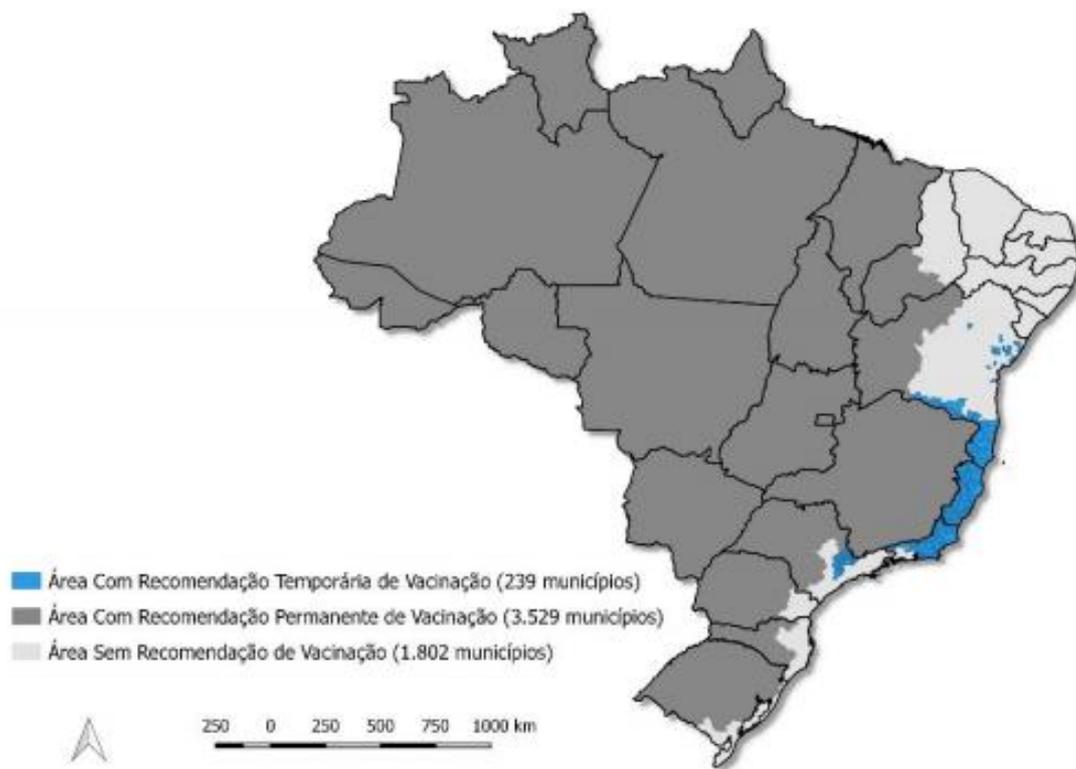


Figura 14. Distribuição dos municípios segundo a recomendação de vacinação para controle de surto e prevenção da Febre Amarela, Brasil, 2017. Fonte: Ministério da Saúde (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febreamarela>).

1.1.5 Vetores

Um número considerável de patógenos tem sido associado com a transmissão vetorial por mosquitos, como é o caso do vírus da febre amarela. Há mais de dois séculos, o estudo dos mosquitos, iniciando-se pela taxonomia e seguindo-se pelo ciclo de vida, nutrição e a investigação da infecção natural por esses organismos tem ajudado no entendimento de seu papel como transmissores e da dinâmica das infecções por eles veiculadas (Steinhaus, 1946). Em algumas espécies de mosquitos, microrganismos podem desempenhar um papel simbiótico, auxiliando, por exemplo, no processo digestivo, mas não há nenhuma evidência direta sobre isso (Steinhaus, 1946). Os parasitos, como arbovírus, que vivem nos mosquitos ou outros artrópodes podem ser considerados como parasitas, porém em poucos casos há evidência de que esses organismos são prejudiciais ou patogênicos para os próprios mosquitos (Steinhaus *et al* 1946; Maciel-de-Freitas *et al* 2011).

Se as infecções por arbovírus em vertebrados são de duração geralmente curtas e auto-limitadas, elas persistem por toda a vida nos artrópodes como mosquitos quando estes são susceptíveis. Por isso, os vetores são, provavelmente, os principais agentes na manutenção da população de arbovírus na natureza.

Os mosquitos são os principais vetores das arboviroses no mundo, desde da descoberta da malária e da febre amarela no século passado, que esses invertebrados contribuem naturalmente com a disseminação de doenças causando grandes epidemias na história da humanidade.

Como muitos arbovírus, o YFV é transmitido naturalmente através da picada de mosquitos vetores. Observações de campo e experimentos em laboratório feitos em aproximadamente 120 anos indicaram que várias espécies de mosquitos, tanto na África quanto na América, são capazes de transmitir o vírus amarílico. No continente africano, o vírus já foi isolado de várias espécies de mosquitos, mas também de

carrapatos da espécie *Amblyoma variegatum*, nas áreas áridas, achando que este artrópode pode ter participação secundária na transmissão do YFV para primatas não humanos. Entretanto, algumas espécies de mosquitos, por seu comportamento, distribuição, frequência e características biológicas favoráveis, associadas à competência vetorial, são os vetores considerados primários e secundários, e serão comentadas abaixo enfatizado.

1.1.6 Vetores da febre amarela na África

Como dissemos, há fortes evidências de que o YFV é originário da África. Naquele continente, outros arbovírus, como ZIKV, DENV-2 e CHIKV, co-evoluíram com espécies de primatas e mosquitos locais. Dentre estas espécies estão aquelas dos subgêneros originalmente restritos ao Velho Mundo, *Stegomyia* e *Diceromyia* do gênero *Aedes*. Dentre os *Stegomyia*, a espécie mais conhecida o *Ae. aegypti* e espécies invasora do continente Americano, Australiano e Asiático.

Existem diferentes ambientes ou condições ecológicas de transmissão do vírus na África: silvestre, rural ou área de emergência e urbana. Em 1942, foi pela primeira vez identificado o vírus no ciclo selvagem de febre amarela na África, onde o vetor incriminado pela transmissão foi *Aedes (Stegomyia) simpsoni* (Mahaffy, 1942). Desde então, muitos inquéritos entomológicos e virológicos permitiram a identificação dos principais vetores envolvidos na transmissão nos diferentes ecossistemas. A transmissão nas áreas florestais de savanas úmidas se faz principalmente às custas do mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus*, que possuem hábitos quase estritamente silvestre e acrodendofílicos (Haddow *et al* 1947, 1948, 1964). Outras espécies de mosquitos que habitam as áreas de savanas, em geral da África Ocidental, estão envolvidas na transmissão do YFV, principalmente duas espécies de *Diceromyia* –

Aedes (Diceromyia) furcifer e o *Aedes (Diceromyia) taylor*, ao passo que nas savanas secas o *Aedes (Stegomyia) luteocephalus*, é o transmissor do vírus, com ocorrência em vilarejos próximos às florestas, onde participa da transmissão no ciclo rural. Na África Oriental e Central, além do *Aedes (Stegomyia) africanus*, o *Aedes (Stegomyia) pseudoafricanus* tem sido incriminando como vetor associados aos surtos de febre amarela silvestre. Ainda, na África Oriental, há existência de vetor que realiza a ligação entre os ciclos urbano e silvestre, representado pela espécie *Aedes (Stegomyia) simpsoni*, que sai da mata indo picar os indivíduos nas periferias das cidades, podendo, além disso, manter a transmissão peri-urbana contínua, ainda que limitada a essas áreas. Nestas situações, populações exofílicas de *Ae. aegypti* participam da transmissão rural e peri-urbana. Todas estas espécies têm em comum o uso de coleções naturais de águas pluviais como criadouros, especialmente em buracos de árvores, com hábitos alimentares primatófilicos e com comportamento acrodendrófilos, com exceção do *Ae. aegypti* neste último aspecto.

Há certa complexidade na transmissão nestes diferentes territórios ecossistemas onde circulam distintos genótipos de YFV (Diallo *et al* 2014). Alguns destes genótipos parecem ter escalas geográficas que correspondem território predominante de uma espécie de mosquito vetor em particular como, por exemplo, *Ae. africanus*, para o genótipo Centro-Leste Africano, e *Ae. simpsoni*, para genótipo do Leste Africano. Várias das espécies vetores silvestres de YFV não permitem a sua colonização em laboratório e, por conseguinte, pouco se sabe sobre sua competência vetorial. É possível que espécies africanas vetoras se comportem diferentemente quando desafiadas oralmente com distintos genótipos africanos.

1.1.7 Vetor urbano

O *Aedes aegypti* é o vetor primário e clássico da febre amarela no ambiente urbano. É provavelmente o mosquito mais estudado no mundo (Christophers 1960). É originário da África, onde apresenta duas formas com coloração e comportamento diferentes: uma mais escura e de comportamento extradomiciliar e que se cria especialmente em buracos em rocha ou em árvores, chamada *Ae. aegypti formosus*, e *Ae. aegypti aegypti*, mais clara, doméstica e que se cria essencialmente em recipientes produzidos por humanos. Esta última é simplesmente denominada *Ae. aegypti*, tendo sido aquela que se dispersou pelo mundo (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Elas também diferem no que concerne à competência vetorial, sendo a forma escura geralmente menos susceptível ao vírus amarelo e mesmo a outros flavivírus, como DENV, que a forma invasora e doméstica (Lourenço-de-Oliveira *et al* 2002, 2004a, Vazeille *et al* 2013).

Por se tratar também de uma espécie invasora do continente Americano e igualmente pertencer ao subgênero *Stegomyia*, embora com distribuição original especialmente no Sudeste da Ásia, comentaremos aspectos da biologia, do comportamento relativos e de parâmetros da capacidade vetorial do *Ae. aegypti* juntamente com o *Ae. albopictus*. A biologia das duas espécies é consideravelmente semelhante, do ovo à forma adulta (Lourenço-de-Oliveira 2015 a,b).

O *Aedes aegypti* está mais adaptado ao meio urbano e o *Aedes albopictus* tem maior plasticidade biológica, ocorrendo tanto nos ambientes urbano/periurbano quanto silvestre (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Porém, ambos possuem associação com os humanos. Apenas as fêmeas realizam o repasto sanguíneo e são extremamente antropofílicas. Além disso, ambas as espécies frequentemente realizam mais de uma alimentação sanguínea por ciclo gonotrófico, o que aumenta

seu potencial em adquirir e transmitir patógenos (Halstead 2008, Lourenço-de-Oliveira 2015a). Apesar de serem mosquitos de hábitos diurnos, ambas as espécies possuem caráter oportunista, podendo se alimentar de sangue a qualquer horário do dia ou da noite (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Cerca de três dias após a ingestão do sangue, as fêmeas geralmente realizam a postura de ovos (Christophers 1960). Inicialmente, os ovos possuem a cor branca e, com a exposição à luz e ao oxigênio, escurecem. A postura dos ovos de ambas as espécies ocorre na parede do criadouro acima do nível da água. Após o término da embriogênese, que dura 2-3 dias após a postura, os ovos adquirem resistência ao ressecamento podem permanecer viáveis por até 450 dias no ambiente seco (Severo 1956). Esta característica é uma vantagem dessas espécies, pois permite que os ovos sejam facilmente transportados passivamente por longas distâncias, aderidos em pneus e outros materiais. Quando submersos, os ovos eclodem dando origem a larvas, que passará por quatro estádios larvares, alimentando-se de matéria orgânica dissolvida na água ou depositada no fundo do criadouro, até atingirem a fase de pupa, quando ocorrerá a metamorfose para a forma adulta. O tempo de desenvolvimento dos imaturos varia de acordo com fatores ambientais bióticos e abióticos, tais como a disponibilidade de recursos, a competição intra e inter-específica e a temperatura da água (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Camara *et al* 2016). Superpopulação larvária e poucos nutrientes no criadouro podem levar à formação de pupas e adultos menores. Fêmeas maiores podem ser mais longevas e terem melhor desempenho como vetoras que as menores (Juliano *et al.* 2014).

No estágio adulto, essas espécies apresentam-se com porte pequeno a médio e coloração escura, com pernas marcadas com faixas pretas e brancas, dando um aspecto sarapintados. Por isso, chamados popularmente como mosquito-tigre, ou, no caso do *Ae. albopictus*, de mosquito-tigre-asiático, em referência a sua origem asiática.

As distinções entre as duas espécies provem de desenho no escudo torácico formado por escamas branco-prateadas em forma de lira no *Ae. aegypti* e por uma faixa longitudinal e central no *Ae.albopictus* (figura 15).



Figura 15. Fotografia das fêmeas *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Fonte: Genilton Vieira.

O *Aedes.aegypti* foi descoberto no Egito, como seu nome sugere. Sua distribuição geográfica atual compreende a maior parte das áreas tropicais e subtropicais da África, Ásia e Américas e também na Oceania (Figura 16). Nessas regiões o mosquito se distribui nas áreas urbanas e suburbanas, onde há alterações antrópicas que propiciam sua proliferação, como a oferta de criadouros, representados por recipientes artificiais com água parada. Encontra-se facilmente em torno ou dentro das residências, pois está sempre próximo aos humanos. Por outro lado, *Ae.aegypti* é raro ou ausente no ambiente rural, onde a população humana é restrita, e é totalmente ausente no ambiente silvestre (Lourenço-de-Oliveira 2015a)

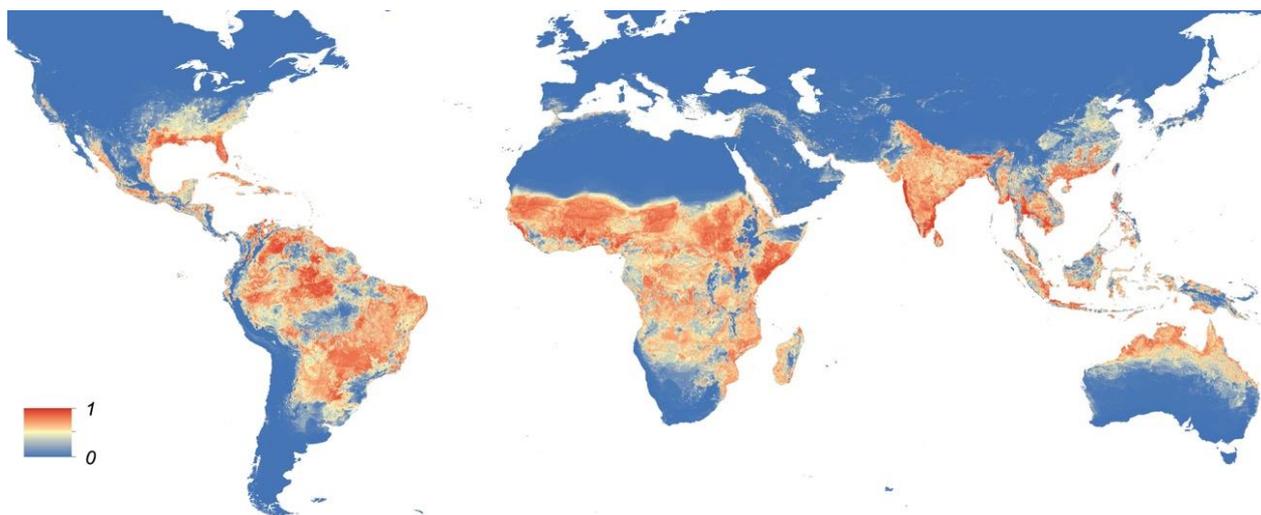


Figura 16. Distribuição geográfica provável de *Aedes aegypti* no mundo. Fonte: Kraemer *et al.* eLife 2015

Aedes albopictus disseminou-se do Sudeste Asiático para as áreas tropicais, subtropicais e temperadas da Ásia, Europa, Austrália e Américas (Figura 17). Consegue tolerar uma larga faixa de temperatura extensa e, assim, é capaz de colonizar áreas onde o inverno pode ser rigoroso. Sua distribuição sobrepõe em algumas regiões com o *Ae. aegypti*, menos nas regiões onde o inverno é rigoroso. *Ae. albopictus* pode ocorrer esporadicamente em áreas urbanas e suburbana e periurbanas, com grande cobertura vegetal, e é encontrado com frequência nas bordas das matas (Braks *et al* 2003, Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2004b, Lourenço-de-Oliveira 2015a).

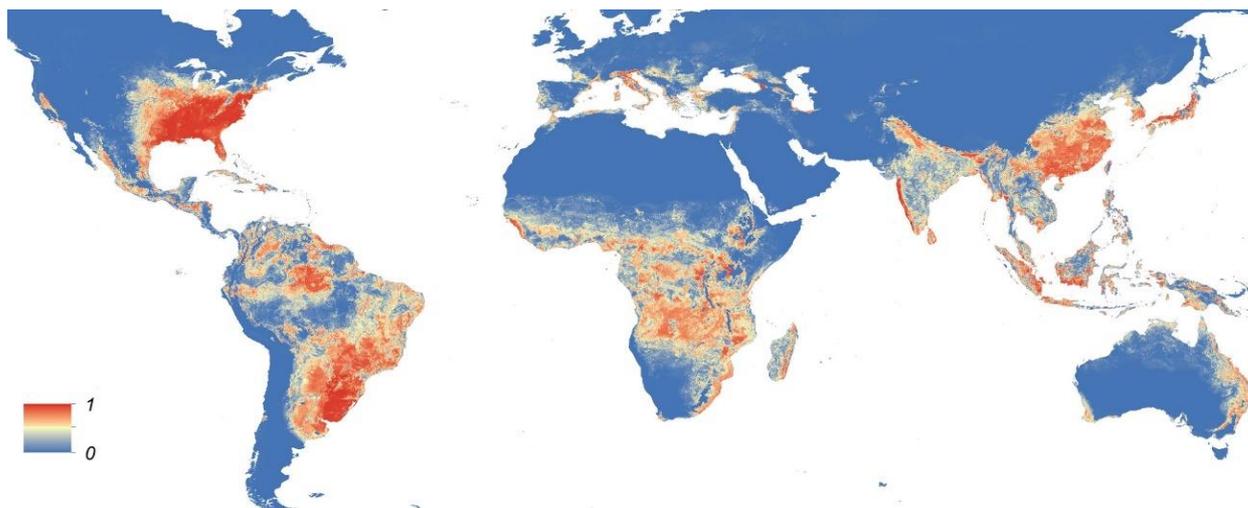


Figura 17. Distribuição geográfica provável de *Aedes albopictus* no mundo. Fonte: Sprenger, 1986.

Aedes aegypti é comprovado vetor natural do YFV, ao passo que *Ae. albopictus* nunca foi incriminado com transmissor desse agente (Christophers 1960, Lourenço-de-Oliveira 2015 a,b). Populações brasileiras e de outros países, tanto de *Ae. aegypti* quanto de *Ae. albopictus* já tiveram sua competência vetorial testada quanto ao vírus amarílico. Na grande maioria das vezes, os testes foram feitos empregando-se colônias de laboratório e as cepas do YFV usadas eram originárias de áreas muito distantes da origem das populações de mosquitos testadas. De modo geral, *Ae. aegypti* demonstra maior competência vetorial para o YFV que o *Ae. albopictus* (Lorenz *et al* 1984, Mitchell *et al* 1987, Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2002, 2003, 2004a, Vazeille *et al.* 2013, Amraoui *et al* 2016)

1.1.8 Vetores silvestres no Brasil

Os principais culicídeos envolvidos com a transmissão da febre amarela no Novo Mundo são, como já dissemos, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e

Sabethes. O gênero *Haemagogus* é restrito ao Novo Mundo e pertence à tribo *Aedini*, a mesma a que pertencem os *Aedes* (Figura 18).

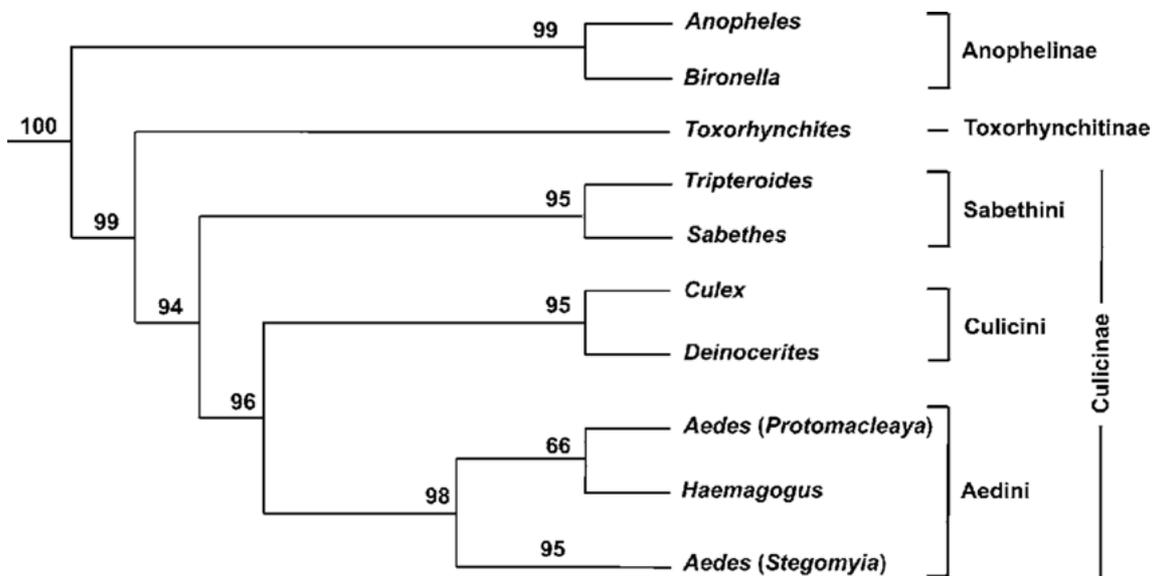


Figura 18. Filogenia de Culicidae, proposta por Harbarch (2007).

O gênero *Haemagogus* apresenta uma vasta diversidade especificada, com 32 espécies (Arnell, 1973). Além do importante papel na transmissão do vírus amarelo os gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* são transmissores de outras arboviroses (Karabatsos 1985). Os vetores do YFV pertencem a dois subgêneros de *Haemagogus*: *Conopostegus* e *Haemagogus*.

1.1.9 *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus*

Até 1972, *Haemagogus leucocelaenus* pertencia ao gênero *Aedes* e ao subgênero *Finlaya*. A partir dos estudos de Zavortink, a espécie foi deslocada para o gênero *Haemagogus*, subgênero *Conopostegus* (Forattini, 2002).

No Brasil, os mosquitos *Hg. leucocelaenus* desempenham papel relevante na transmissão do vírus da febre amarela na sua forma silvestre, atuando na manutenção do ciclo dessa zoonose, especialmente no Sul e Sudeste (Kumm & Cerqueira 1961, Cardodo *et al* 2008, Souza *et al* 2009). Com efeito, o vírus da febre amarela foi isolado de mosquitos *Hg. leucocelaenus*, em 1938, de pool composto de 16 espécimes coletados no estado do Rio de Janeiro. O mesmo aconteceu, em 1944, um pool com seis *Hg. leucocelaenus* coletados na floresta de Villavicencio, Colômbia. Seis anos mais tarde, duas amostras de vírus amarelado foram isoladas de um pool de 15 mosquitos *Hg. leucocelaenus* coletados na copa das árvores, durante uma epizootia em área rural no noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Quarenta anos mais tarde, durante os quais não houve detecção de atividade do vírus em mosquitos dessa espécie, obteve-se a confirmação da participação de *Hg. leucocelaenus* na transmissão de febre amarela silvestre envolvendo PNHs e casos humanos na região sul do Brasil (Almeida *et al* 2012).

Hg. leucocelaenus ocorre, principalmente em florestas tropicais, é um mosquito essencialmente silvestre, mas que pode se deslocar para fora da floresta e voar longas distâncias entre matas residuais, comportamento que favorece a transmissão do YFV (Causey *et al.* 1950, Pinheiro *et al* 1981). Sua distribuição geográfica estende-se de Trinidad, no Norte da Argentina e na América Central. No Brasil, ocorre principalmente nos Estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O estágio larval do *Hg. leucocelaenus* se desenvolve principalmente em ocos de árvore, mas pode ocorrer em internódios de bambus, nas axilas das folhas, cascas de frutas e ocasionalmente em escavações de rochas. Seus ovos são resistentes à dissecação por aproximadamente 150 dias o que garante a sobrevivência das populações nas estações muito secas. Os ovos podem apresentar dois tipos de

comportamento em relação à eclosão: parte vai eclodir no primeiro contato com água, e parte continua a eclodir depois de submersos pelos seguintes dias; ou não ocorrendo a eclosão nos dois primeiros dias de contato com a água, mas sim a partir de 10 dias do desenvolvimento do embrião. Com isso se dão múltiplas e paulatinas eclosões de uma mesma desova a partir das imersões dos ovos na água. Múltiplas imersões na água parecem ter efeito favorável para eclosão de ovos desta espécie (Alencar *et al* 2014). Desde a eclosão até a fase adulta, o ciclo imaturo de *Hg.leucocelaenus* tem duração de 7 a 10 dias em condições de laboratório.

Os adultos tanto machos e fêmeas são de colorido escuro, com manchas claras brilhantes. Uma característica morfológica marcante é a existência de três faixas paralelas e oblíquas de escamas prateadas na pleura torácica. As patas não têm anéis claros nos tarsos. São mosquitos diurnos e acrodendrófilos, onde as fêmeas se alimentam nos primatas, embora possam ser coletados atacando os indivíduos que se encontram próximos ao solo da floresta. Humanos são picados principalmente entre 10:00 a 15:00 horas, o seu período de maior atividade. A abundância do *Hg.leucocelaenus* tem variação sazonal dependente da precipitação pluviométrica, sendo sua população geralmente muito reduzida durante as estações secas, entretanto nunca desaparece totalmente da floresta. Além disso, tem sido encontrado frequentemente próximo dos domicílios humanos (Trapido e Galdino, 1957; Pinheiro *et al* 1981).



Figura 19. Fotografia de fêmea de *Haemagogus leucocelaenus*. Fonte: Genilton Vieira.

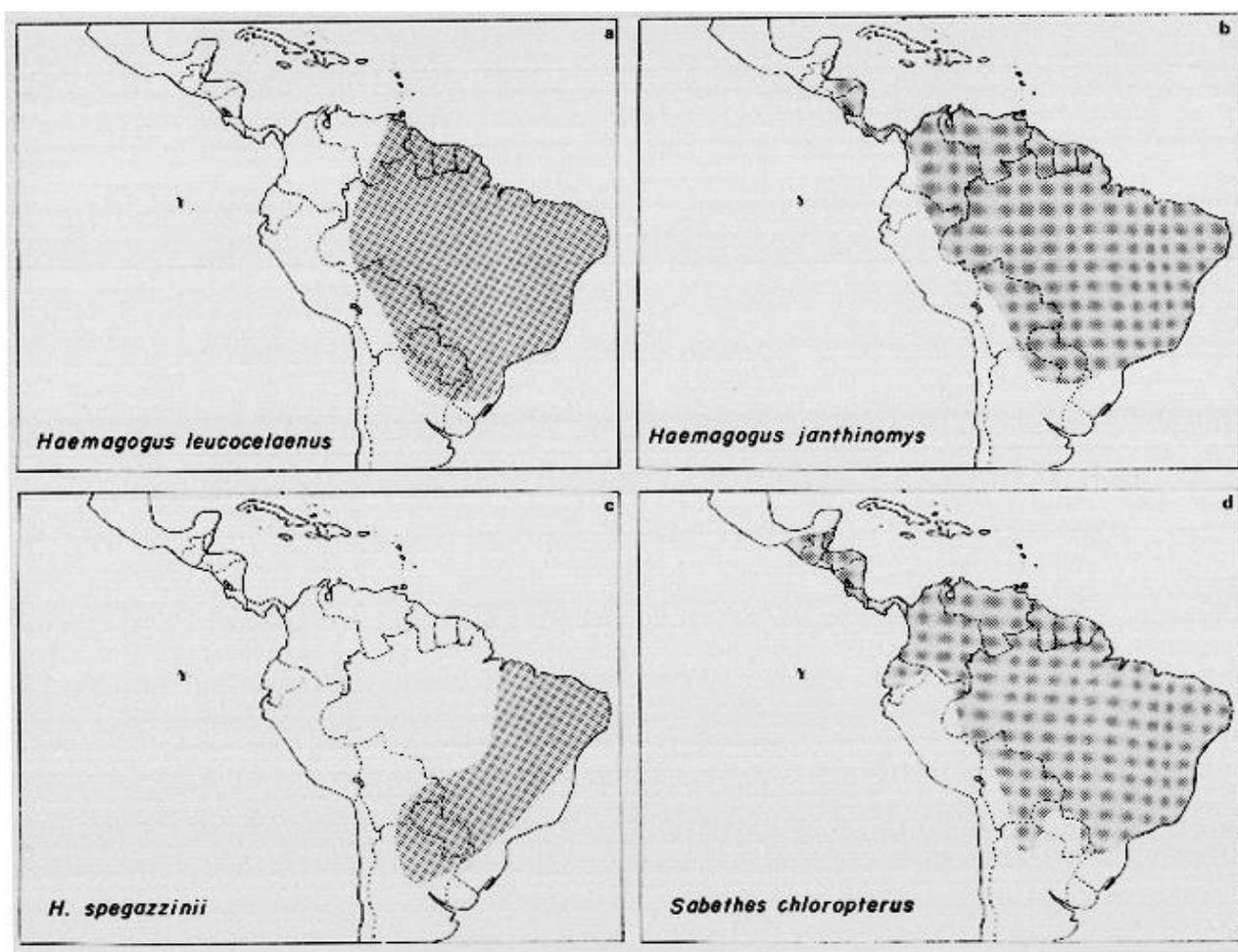


Figura 20. Distribuição geográfica das espécies de *Haemagogus leucocelaenus* e de *Sabethes chloropterus* nas Américas. Fonte: WHO (1989).

Várias espécies do subgênero *Haemagogus* têm sido incriminadas vetoras naturais de febre amarela no continente Americano, tais como *Hg. janthinomys* Dyar, *Hg. albomaculatus* Theobald, *Hg. spegazzinii* Brethes e *Hg. capricornii* Lutz. *Hg. albomaculatus* teve sua participação como vetora confirmada no norte do Brasil, ao passo que o papel vetorial de *Hg. spegazzinii* e de *Hg. capricornii* é considerado, hoje, de menor importância (Hervé *et al.*, 1985, Hervé *et al.*, 1986, Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Por outro lado, *Hg. janthinomys* é considerado o principal vetor primário do vírus amarílico nas Américas no ambiente silvestre, uma vez que esta espécie apresenta as melhores condições para transmitir o vírus: pois tem larga distribuição geográfica, pica com frequência primatas no nível da copa das árvores e é extremamente suscetível ao vírus, podendo se infectar experimentalmente com baixas doses infectantes (Arnell 1977, Hervé *et al.* 1986, Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Vasconcelos *et al.*, 2001). Os aspectos da biologia e comportamento de todas estas espécies se assemelham ao descrito para *Hg. leucocelaenus*.

1.1.10 *Sabethes albiprivus*

O gênero *Sabethes* pertence à tribo *Sabethini* (Figura 22). É considerado o grupo de mosquitos que abrange grande número de espécies com muita diversidade, tanto no aspecto morfológico quanto biológico (Forattini, 2002). Os adultos são mosquitos muito bonitos, coloridos, possuem o tórax e abdome revestido de escamas de aparência metálica nos tons de azul e verde, e as pernas com reflexos azul-violáceo e às vezes com partes brancas (Hancock e *et al* 1990). São mosquitos restritos ao Novo Mundo e essencialmente às florestas tropicais, de onde não se afastam muito para picar no descampado, como descrito acima para *Hg. leucocelaenus*. Seus criadouros são ocos de árvores e internódio de bambu, geralmente com orifício pequeno aberto ao exterior, dependendo da espécie (Consoli

& Lourenço-de-Oliveira 1994). Em observações realizadas em laboratório, verificou-se adaptação a esses tipos de criadouros que provavelmente condicionou o mecanismo pelo qual a fêmea desova. Uma vez encontrado no orifício, a fêmea permanece flutuando no ar, em frente ao mesmo, toma distância do orifício e projeta o abdômen em direção a essa abertura, lançando os ovos com precisão através desses orifícios. Os ovos de *Sabethes* não resistem à dessecação e as posturas são efetuadas durante o dia, horário de hematofagia na floresta. Em condições de laboratório, o período decorrido entre a eclosão da larva até o surgimento do adulto é três vezes mais longo que em *Hg. leucocelaenus* e *Ae. aegypti*: dura em média 30 dias (Galindo 1957, Gerber 1970).

As fêmeas de *Sabethes albiprivus* Theobald, realizam hematofagia nas horas claras do dia e com temperatura elevada, principalmente junto à copa das árvores. Mas é facilmente vista atacando humanos. Nesse momento, vários animais arborícolas estão adormecidos ou com sua atividade reduzida, o que ajuda na alimentação sanguínea. Morfologicamente, destacam-se as pás formadas por longas escamas presentes nos tarsos das pernas medianas. Em repouso, as pernas posteriores formam um arco, voltadas para frente, sobre o tórax e a cabeça. (Figura 21).



Figura 21. Fotografia de *Sabethes albiprivus* mentidos em colônia em laboratório.
Fonte: <http://www.fiocruzimagens.fiocruz.br/media.details.php?mediaID=4688>.

As fases imaturas de *Sa. albiprivus* vivem em ocos de árvores com abertura estreita para o exterior. Quanto à importância na transmissão da febre amarela, esta espécie foi achada naturalmente infectada com o YFV na Argentina (Goenaga *et al* 2012). Sua competência vetorial para o YFV ainda não foi avaliada.

1.1.11. Competência Vetorial

O termo competência vetorial refere-se à capacidade que um artrópode vetor tem em se infectar, permitir a replicação, disseminação e transmissão de parasitos. Trata-se de um fenótipo avaliado quantitativamente e que é governado geneticamente, dependendo de interação entre os genótipos do parasito, em nosso caso um vírus, e do vetor, mas que também sofre influência da temperatura ambiente (Lambrechts, 2009, Zouache *et al* 2014). Sendo a competência vetorial determinada geneticamente, indivíduos de uma mesma espécie, porém de população geográfica

diferentes, podem se comportar distintamente frente ao desafio oral representado pelo repasto sanguíneo contendo vírus. O fenótipo pode ser estimado por várias taxas, dependendo do momento em que se encontra a infecção. Inicia-se pela avaliação da proporção de mosquitos que, tendo ingerido sangue com vírus, apresentam infecção no tubo digestivo, chamada taxa de infecção. Em seguida, estima-se a taxa de indivíduos em que a infecção foi disseminada do tubo digestivo (tecido primário) para tecidos secundários, após um tempo de incubação, chamada taxa de disseminação. Por último, a proporção daqueles que eliminam o vírus na saliva é denominada taxa de transmissão (Lourenço-de-Oliveira 2015 a, b).

Uma série de fatores intrínsecos determinam a evolução da infecção de vírus num inseto que, por sua vez, influenciarão nos valores das taxas de competência vetorial. Por exemplo, a presença de barreiras próprias do inseto, capazes de impedir que o vírus infecte as células alvo, replique e dissemine até chegas às glândulas salivares. Dentre essas barreiras se destacam, na sequência da infecção (Figura 22): a barreira de infecção do intestino (MIB, do inglês *midgut infection barrier*), barreira de escape do intestino (MEB, do inglês *midgut escape barrier*), que controla a disseminação para os tecidos secundários, a barreira de infecção das glândulas salivares (SGIB, do inglês *salivary gland infection barrier*), que governa a penetração do vírus da hemocele para dentro das glândulas salivares, e a barreira de escape das glândulas salivares (SGEB, do inglês *salivary gland escape barrier*), que controla a saída do vírus dos ácinos da glândula para a luz dos ductos salivares, de modo que a saliva eliminada esteja contaminada com o vírus (Hard e Houk, 1991).

BARREIRAS DE INFECÇÃO

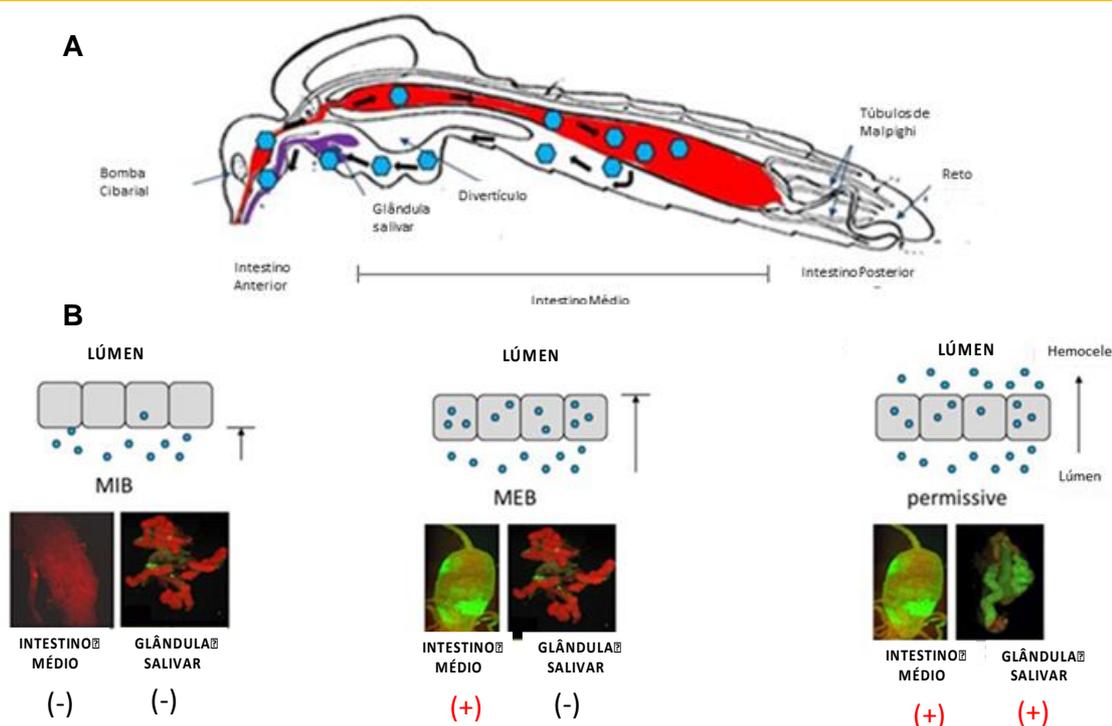


Figura 22. Esquema mostrando momento e barreiras da infecção de um mosquito vetor por arbovírus. (A) Representação esquemática do tropismo tecidual de arbovírus em um mosquito vetor. Partículas virais são representados por hexágonos azuis. (B) Representação esquemática de uma infecção permissiva do intestino médio, barreira da infecção do intestino médio (MIB) e barreira de escape do miocárdio (MEB). Os quadrados cinzas representam as células epiteliais do intestino médio e os hexágonos azuis representam os vírus. Abaixo, imagens de intestino médio (MG) e glândulas salivares (SG) de *Aedes aegypti* desafiados com DENV-2 revelado por imunofluorescência. Adaptado de Franz *et al* (2015).

Assim, um indivíduo, uma população ou uma espécie de inseto que apresenta MIB, o vírus não consegue infectar as células do intestino ou quando infectam, ocorre baixa replicação e a infecção é debelada (Figura 22). Nas espécies ou indivíduos de uma população que apresentam a barreira de infecção das glândulas salivares, os vírus não infectam as glândulas. Uma vez que as glândulas salivares não estão contaminadas com o vírus, o mosquito não poderá transmiti-lo ao hospedeiro no

momento de uma próxima hematofagia (Black IV *et al* 2002, Bosio *et al* 1998, 2000). Deve-se considerar também que outros fatores além dos descritos como governadores da competência vetorial podem ter grande importância na determinação deste fenótipo, como, por exemplo, a microbiota intestinal do inseto, cuja multiplicação simultânea àquela dos vírus pode desencadear forte resposta imune, que poderá atingir ambos, a microbiota e o vírus em variável intensidade (Xi *et al* 2008).

Arbovírus são mantidos na natureza em ciclos que incluem infecção e replicação alternada em vertebrados e invertebrados hematófagos, o que significa demanda de capacidade de penetrar e replicar em células muito distintas e escapar de resposta imune destes hospedeiros, e assim por diante. Estes processos ajudam a selecionar subpopulações virais e influenciam na variabilidade genética dos vírus. Por isso, estudo das interações entre vírus e o vetor e de como estas interações formatam ambas as pressões evolutivas específicas do vetor e do próprio vírus são necessárias para se poder melhor avaliar os fatores que governam o potencial que o vírus tem em se adaptar aos vetores ou/e de se expandir geograficamente (Ciota e Kramer, 2010).

1.2 JUSTIFICATIVA

Desde o desenvolvimento e aplicação frequente da vacina atenuada, nos anos 1930, e com o sucesso do programa de erradicação continental do *Ae. aegypti*, houve interrupção da transmissão urbana da febre amarela no Brasil, país declarado livre do vetor urbano em 1957 (Soper 1963). Apesar da reinvasão do *Ae. aegypti* no Brasil, na década de 1960/70, e o seu franco espalhamento no território até os dias atuais, as infecções humanas pelo vírus da febre amarela no país vem sendo adquiridas

somente no ciclo silvestre nas últimas sete décadas. O ciclo silvestre gera surtos epizoóticos, em ondas, que se propaga no território (Monath & Vasconcelos 2015). Durante essas ondas epizoóticas, humanos são contaminados pela picada de mosquitos que habitam as copas das árvores, pertencentes aos gêneros *Haemagogus* (vetores primários) e *Sabethes* (tidos como vetores secundários) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Vasconcelos *et al.* 2004).

Desde 2016, uma grave epidemia de febre amarela tem sido relatada no sudeste do Brasil, causando 264 mortes, confirmadas em laboratório ([http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/19/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-41---Atualização-em-18 maio 2017.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/19/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-41---Atualização-em-18%20maio%202017.pdf)). Trata-se talvez da mais alarmante epidemia, que vem se espalhando, progressivamente em direção leste, causando mortes de PNHs e humanos em áreas livres de febre amarela por mais de 70 anos. Os agravantes principais são que constituem populações humanas com baixa cobertura vacinal e áreas que estão dentre as mais infestadas pelos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Se a reinvasão e o reestabelecimento do *Ae. aegypti* no Brasil já representava uma ameaça por si (Massad *et al* 2001), a invasão e propagação do *Ae. albopictus* desde o final dos anos 1980, intensificaram o risco de surtos de febre amarela urbana no Brasil (Figura 23) (Carvalho *et al* 2014).

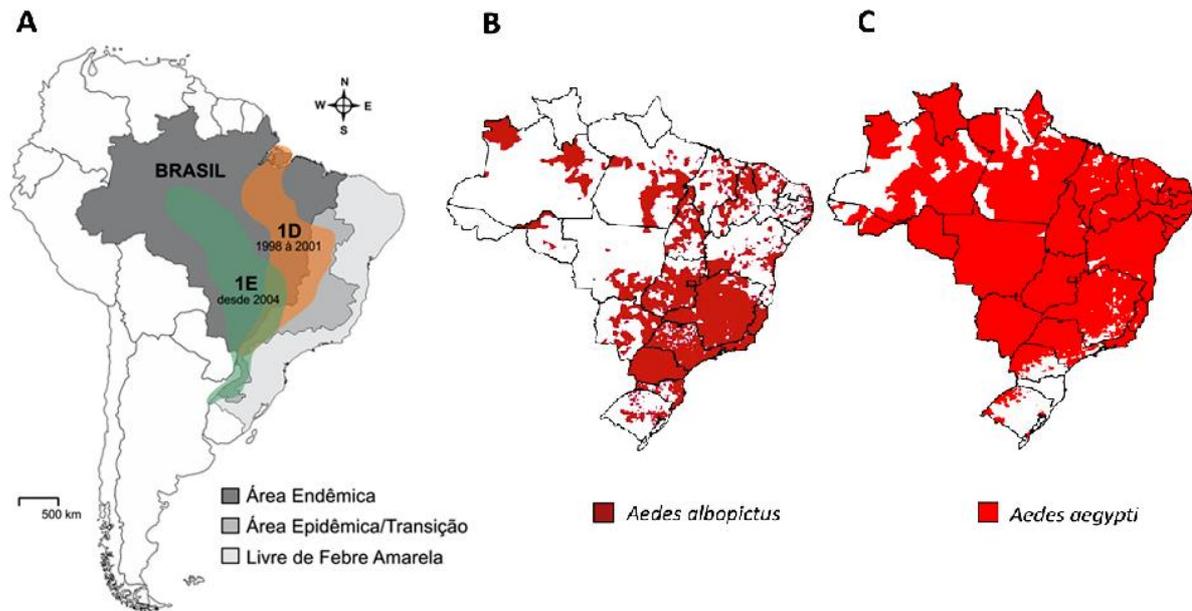


Figura 23. Distribuição geográfica aproximada de linhagens (1D e 1E) do genótipo do vírus da febre amarela do genótipo Sul-americano I (A) e dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Brasil (B e C). Adaptado de Romano *et al* (2014) e Carvalho *et al* (2014). Na imagem A, as manchas em diferentes tons de cinza correspondem as áreas endêmica (escuro) e epidêmica (tom intermediário), ambas com recomendação de vacinação, e livre de febre amarela (claro), em 2014 (Romano *et al* 2014).

Além disso, algumas populações brasileiras de ambas as espécies, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, já se mostraram suscetíveis e capazes de transmitir experimentalmente algumas cepas do vírus da febre amarela (Miller e Ballinger 1988, Lourenço-de-Oliveira *et al* 2002, 2003, 2004).

O mosquito *Ae. albopictus* é uma espécie muito oportunista, capaz de colonizar uma grande variedade de habitats, além de ter a possibilidade de realizar a hemaotofagia em uma gama de diferentes mamíferos. Pode também se mover da floresta para sítios peri-urbanos e vice-versa (Lourenço-de-Oliveira *et al* 2004c, Maciel-de-Freitas *et al* 2006). Coincidentemente, os mais altos índices de infestação por *Ae. albopictus* no Brasil são encontrados nas regiões Sudeste e Sul, onde o vírus da febre amarela atualmente está circulando epizootica e epidemicamente (Figura 07,

Carvalho *et al* 2014). Nossa hipótese é que *Ae albopictus* do Brasil, em especial de áreas no Sudeste, sendo competentes ao vírus da febre amarela, pode desempenhar o papel de "vetor ponte", ligando o ciclo silvestre ao ciclo urbano de febre amarela. Ou seja, que essa espécie pode ter um papel chave no ressurgimento da febre amarela urbana no Brasil.

É imperativo, portanto, que se avalie o potencial deste mosquito transmitir o vírus amarílico. Assim, neste trabalho, comparamos a competência vetorial para três cepas do vírus em populações africanas e brasileiras de *Ae. albopictus* com populações de *Ae. aegypti*, que coexistem com as de *Ae. albopictus*, no Brasil e Congo, e com vetores silvestres neotropicais, dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*.

Por outro lado, o mosquito *Hg. leucocelaenus* tem se mostrado um dos mais frequentes nos focos silvestres no Brasil, e já foi encontrado naturalmente infectado com o YFV (Vasconcelos *et al.* 2001, 2003, Camargo-Neves *et al.* 2005). Assim, *Hg. leucocelaenus* e outros mosquitos silvestres frequentes nas matas, como *Sabethes albiprivus*, onde potencialmente há transmissão do YFV devem ser investigados quanto a sua competência vetorial para o vírus amarílico.

Sendo a competência vetorial um fenótipo quantitativo determinado e controlado geneticamente, a sua determinação em diferentes espécies e populações de mosquitos urbanos, suburbanos e silvestres do Brasil em especial das fluminenses, onde há grande densidade humana com baixa cobertura vacinal, é indispensável à compreensão da dinâmica da sua transmissão, assim como para fornecer informações para instruir melhor a vigilância e as ações de profilaxia e controle.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o risco de ressurgimento da febre amarela urbana no Brasil, a partir da determinação da competência vetorial de populações naturais de mosquitos urbanos e silvestres para o YFV.

2.2 Objetivos Específicos

Estimar e comparar as taxas de infecção, disseminação e transmissão do YFV nas quatro espécies de mosquitos - *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. Albiprivus* - frente à isolados representantes dos genótipos Sul Americano I e Oeste Africano, aos 3^o, 7^o, 14^o e 21^o dia pós desafio oral, de modo a determinar a susceptibilidade e o período de incubação extrínseco segundo a combinação cepa do vírus-espécie de mosquito.

Determinar, comparativamente, competência vetorial para o YFV de populações naturais de mosquitos urbanos ou suburbanos - *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* – oriundas de áreas endêmicas, epidêmica/epizoótica e livre de febre amarela do Brasil e do Congo, quando desafiadas oralmente com isolados representantes dos genótipos Sul Americano I e Oeste Africano.

Avaliar o potencial de *Ae. albopictus* agir como facilitador da re-urbanização da febre amarela no Brasil segundo a competência vetorial de populações que ocorrem dentro ou fora de áreas de transmissão.

Avaliar, comparativamente aos mosquitos urbanos. A competência vetorial de duas espécies de mosquitos silvestres - *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus* - provenientes de áreas ainda livres de febre amarela, no Rio de Janeiro, frente ao YFV genótipos Sul Americano I e Oeste Africano.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

As instalações de animais do Instituto Pasteur receberam credenciamento do Ministério da Agricultura para realizar experimentos em animais vivos em conformidade com os regulamentos franceses e europeus sobre os cuidados e proteção dos animais de laboratório. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de uso animal do Instituto Pasteur (IACUC), pelo Instituto Oswaldo Cruz licença CEUA-IOC LW-34/14. Coleções de Mosquitos de Florestas Atlânticas do Rio de Janeiro, foram aprovados pelas autoridades locais (PNMNI licença 002/14-15; SISBIO-MMA licença 37362-2 e 012/2016). Não foram necessárias licenças específicas para a realização de coleta de mosquitos nas áreas urbanas e suburbanas no Brasil e do Congo. Este estudo não envolvia espécies ameaçadas de extinção ou protegidas.

3.2 Mosquitos

Dez populações de mosquito da América do Sul e Africano, originadas de três regiões contrastantes (enzoótica, epidêmica/epizoótica e áreas livres febre amarela) foram desafiadas com 3 cepas do vírus da febre amarela: quatro populações de *Ae. albopictus*, quatro populações *Ae. aegypti*, uma de *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) e uma de *Sabethes albiprivus* Theobald (Tabela 1).

Nós testamos amostra de populações pareadas e simultaneamente da mesma área de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* (ou seja, do Brasil e do Congo). Da mesma forma, foram estudadas as quatro espécies (*Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Hg. leucocelaenus* e

Sa. albiprivus) coletadas no Rio de Janeiro, na área do teste (Tabela 1). As populações foram derivadas dos ovos coletados com ovitrampas (Figura 24; A). As ovitrampas consistem de pequenos recipientes de plástico, na cor preta, com capacidade de 500 ml, contendo uma infusão com serapilheira, usadas como atraente para as fêmeas na oviposição, e palhetas de aglomerado (Eucatex) mediam 13cm x 3cm com um de seus lados áspero tornando-se adequadas para a postura. Ficaram dispostas verticalmente e cada uma presa por um clipe à borda interna da ovitrampa, sendo devidamente identificadas com o número respectiva sua ovitrampa. As palhetas, parcialmente imersas na água, foram os suportes para a oviposição. No recipiente foi perfurado um orifício na lateral superior para regular o nível da água, garantindo a faixa de oviposição e com isso se obtém um melhor rendimento quando as armadilhas são expostas em ambientes externos. As ovitrampas permaneceram no campo durante 15 dias para, obtenção dos ovos de *Hg. leucocelaenus*, e 7 para os ovos de *Aedes*, quando foram trocadas as palhetas por uma nova que permaneceram suspensas nas copas das árvores de 3-12m de altura para coletar *Hg. leucocelaenus* ou ao solo para coletar os *Aedes*. Para *Hg. leucocelaenus*, que não se mantém colônia em condições de laboratório a geração F₀ derivada dos ovos coletados em 2015 foram usados para as infecções. No caso de *Sa. albiprivus*, os mosquitos utilizados foram provenientes de uma colônia estabelecida no Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) desde 2013.

Ovitrampas eram providas de 1 a 3 palhetas de madeira. Os ovos eclodiram submergindo as palhetas na água da torneira sem cloro durante dois dias consecutivos. As larvas foram criadas em cubas (25X25X10cm) contendo um litro de água desclorificada e alimentadas com levedo de cerveja, que era renovado a água e o levedo a cada 2 dias. No caso *Hg. leucocelaenus*, adicionamos folhas que serviam de abrigo para as larvas, além de levedo de cerveja em pó na água. Os ovos de *Hg.*

leucocelaenus, necessitam de múltiplas imersões para que ocorra a eclosão em sua totalidade, entretanto, uma maior taxa de eclosão provem da 1º imersão.

Foram criadas 100 larvas/cuba para *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Hg. leucocelaenus* e para *Sa. albiprivus* colocamos 50 larvas por cuba (Figura 24, B). A emergência de adultos da F₀ foram morfológicamente identificados (32) mantendo no insetário (28 ± 1°C; 80 ± 10% RH; um ciclo claro e escuro de 16h : 8h) e os adultos foram alimentados com 10% sacarose para os *Aedes* e uma solução de hidromel para *Hemagogus* e *Sabethes*. Fêmeas de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Sa. albiprivus* (Figura: 24; C) foram alimentadas três vezes na semana com camundongos anestesiados para a produção de ovos.

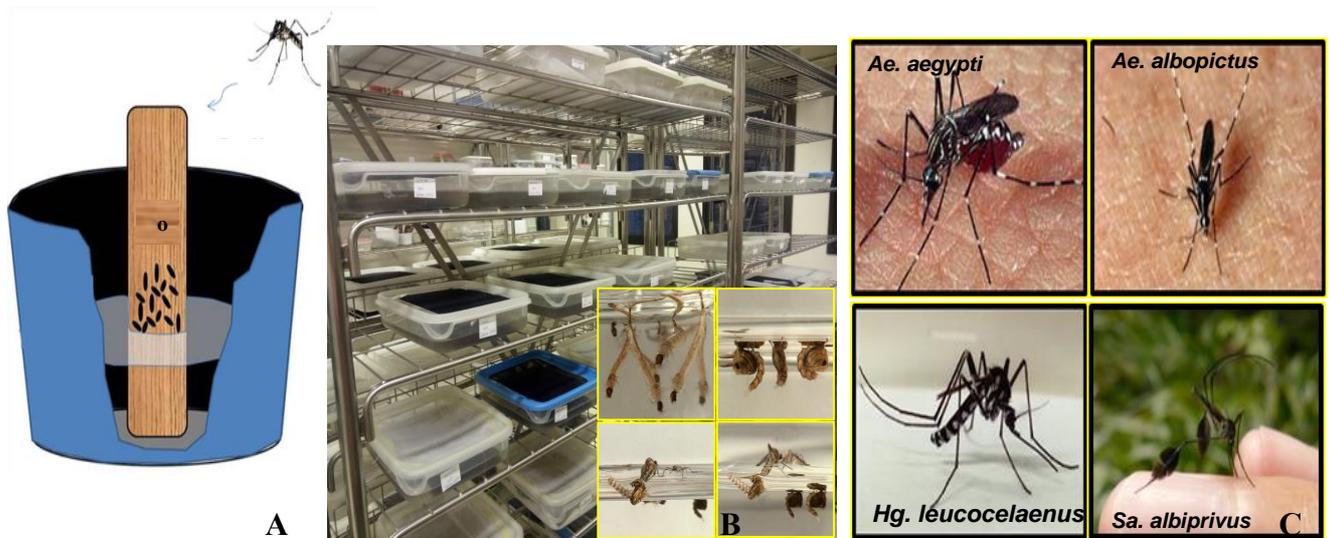


Figura 24. Desenho esquemático de uma ovitrampa (a), Criação dos mosquitos (b), Espécies desafiadas com as três cepas do vírus da febre amarela (C).

Tabela 1- Populações de mosquitos desafiadas as cepas do vírus da febre amarela.

População Mosquitos	Local de coleta	Continentes	País	Cenário epidemiológico	Geração usada	Espécie de mosquito
AL-MAN	Manaus, Amazônia	América do Sul	Brasil	Endêmica	F ₁	<i>Ae. albopictus</i>
AE-MAN	Manaus, Amazônia	América do Sul	Brasil	Endêmica	F ₁	<i>Ae. aegypti</i>
AL-GOI	Goiânia, Goiás	América do Sul	Brasil	Epizootica/epidêmica	F ₁	<i>Ae. albopictus</i>
AE-GOI	Goiânia, Goiás	América do Sul	Brasil	Epizootica/epidêmica	F ₁	<i>Ae. aegypti</i>
AL-RIO	Nova Iguaçu, Rio de Janeiro	América do Sul	Brasil	Área livre de FA	F ₁	<i>Ae. albopictus</i>
AE-RIO	Urca, Rio de Janeiro	América do Sul	Brasil	Área livre de FA	F ₁	<i>Ae. aegypti</i>
Haemagogus	Nova Iguaçu, Rio de Janeiro	América do Sul	Brasil	Área livre de FA	F ₀	<i>Hg. leucoceleus</i>
Sabethes	Tinguá, Rio de Janeiro	América do Sul	Brasil	Área livre de FA	>F ₁₀	<i>Sa. albiprivus</i>
AL-COM	ORSTOM campus, Brazzaville	África	Congo	Epizootica/Endêmica	>F ₁₀	<i>Ae. albopictus</i>
AE-COM	ORSTOM campus, Brazzaville	África	Congo	Epizootica/Endêmica	>F ₁₀	<i>Ae. aegypti</i>

3.3 Vírus

Os mosquitos foram desafiados com três cepas isoladas de YFV: Duas pertencentes ao genótipo Sul Americano I, isolado no Brasil, correspondente a duas distintas linhagens 74018 FIOCRUZ/MG/01 (YFV-74018), isolada de um caso humano fatal em 2001, pertencentes à linhagem 1D (33) e o IEC-4408 (YFV-4408), a partir da linhagem 1E. A cepa recebeu o código BeAn754036/RS-Brazil/2008 no Instituto Evandro Chagas, Belém, tendo sido isolada do bugio *Alouatta* sp, no Rio Grande do Sul, em 2008. Seu genoma completo foi recentemente sequenciado e a sequência depositada no Genbank sob o registro KY861728 (PF Vasconcelos), e uma cepa [S79-P4 (YFV-S79)] linhagem do Leste Africano, isolada de um caso humano no Senegal em 1979 (34). As cepas YFV-74018 e YFV-4408 foram isoladas a partir do soro em cultivo celular de *Ae. albopictus* C6/36, e quatro vezes na mesma linhagem celular, enquanto YFV-S79 foi passada duas vezes em camundongos recém natos e duas vezes em cultivo celular C6/36. Os estoques virais de todas as cepas foram produzidos em cultivo celular de C6/36 um mesmo lote, e armazenados a -80°C até serem utilizadas para os ensaios das infecções experimentais nos mosquitos.

3.4 Experimentos

Fêmeas de seis a oito dias de idade foram agrupadas em gaiolas de plástico para alimentação (60 fêmeas/gaiolas) e ficaram sem qualquer alimentação por 24h, exceto para *Sa. albiprivus* que estavam sedentos por 48h. As fêmeas foram alimentadas com sangue infectados contendo duas partes de eritrócitos do coelho lavados, e uma parte da suspensão viral suplementada com um fagoestimulante (ATP)

em uma concentração final de 5mM e mantidas a 37°C, (Figura 25). As alimentações sanguíneas infecciosas continham no final um título viral de 10⁶ FFU/ml. A alimentação dos mosquitos tinha um período limite de 1 hora. Somente as fêmeas completamente ingurgitadas foram separadas e incubadas em temperatura constante de 28°C e 80% de Umidade com fotoperíodo claro e escuro de 16h:8h com acesso diário à uma solução a 10% sacarose ou de hidromel. Para cada combinação de populações de mosquitos e cepa viral, amostra de 20 mosquitos foram examinadas em 3, 7, 14 e 21 dias depois da exposição aos vírus para determinar o índice de competência vetorial, (Figura 25). A taxa de infecção (TI) refere-se à proporção de mosquitos com corpo infectado entre os ingurgitados. Taxa de disseminação (TDI) corresponde à proporção de mosquitos com cabeça infectados entre os mosquitos infectados detectados anteriormente (ou seja, abdômen/tórax positivo). Taxa de transmissão (TT) representa a proporção de mosquitos com saliva infectada entre os mosquitos com positivos para disseminação da infecção viral.

Os mosquitos foram processados como a seguir: Abdômen e tórax (referidos aqui adiante como corpo) foram testados para determinar a infecção, usamos a cabeça para a disseminação e a saliva para transmissão. Para determinar a infecção viral e as taxas de difusão, cada mosquito corpo e cabeça foram triturados respectivamente em 500 µL e 300 µL de meio para cultivo Leibovitz L15 (Invitrogen®) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), centrifugado a 10.000 rpm for 5 min a 4°C.

Para a inoculação dos triturados (corpo e cabeça) e saliva foram preparadas placas de 96 poços com monocamada do cultivo celular de C6/36 24h antes do inóculo, na concentração celular de 6,2X10⁵. Após 50ul das amostras foram inoculados nas placas quando incubamos por 1h a 28°C. Após o período de 1h o inóculo foi retirado e acrescentado uma solução de 150ul CMC (carboximetil celulose)

a 3,2% em meio de cultivo Leibovitz L15 suplementado com 10% de SFB adicionados por poço. Após sete dias de incubação a 28°C, as células foram fixadas com 3,6% de formaldeído, lavada por 3 x em PBS 1x e reveladas usando fluido ascético hiperimunes, no caso específico para YFV, como o anticorpo primário e Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG de cabra como o segundo anticorpo (Life Technologies) (Vazeille, 2013). Para a estimativa da taxa de transmissão viral, as amostras das salivas dos mosquitos infectados foram coletadas individualmente, em ponteiras contendo 5ul de SFB, subseqüentemente misturados em 45ul de meio L15. Segui-se inoculação em cultura de célula C6/36 e revelação como descrito acima, (Figura 28).

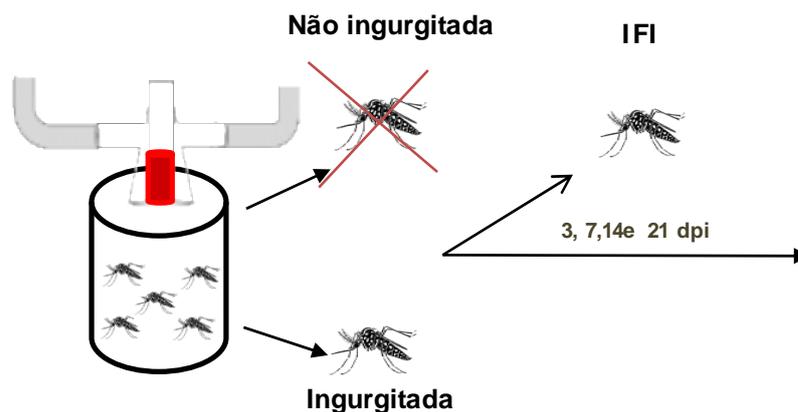


Figura 25. Desenho esquemático da alimentação infectante das fêmeas de mosquitos. Fonte: Stéphanie Campos, 2017.

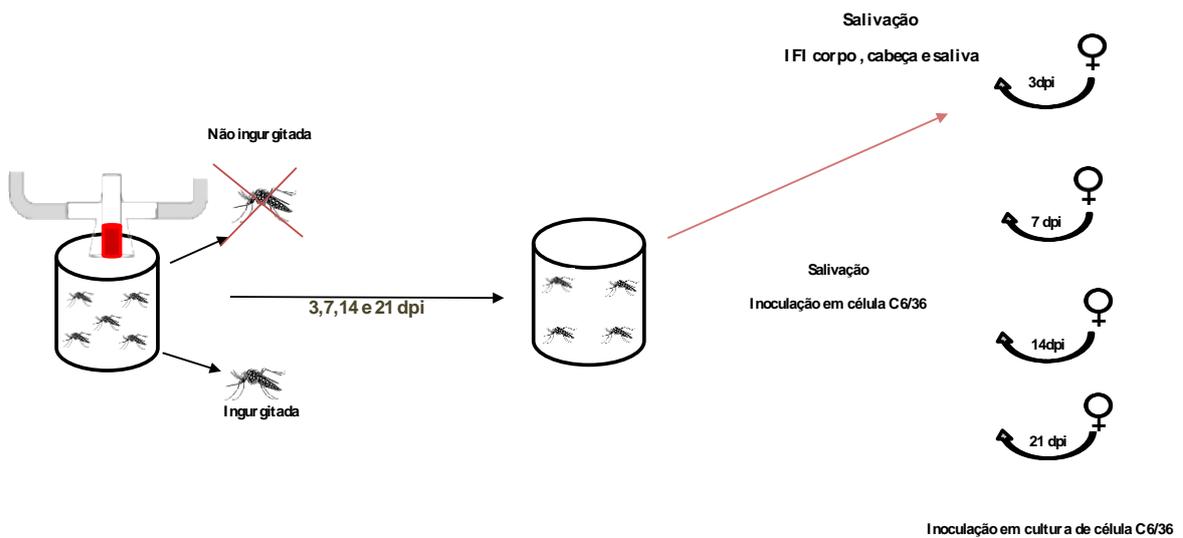


Figura 26. Desenho esquemático do processamento das fêmeas ingurgitadas e inoculação dos triturados (Cabeça e corpo) e salivas nos cultivos. Fonte: Stéphanie Campos, 2017.

4 RESULTADOS

No total, considerando todas as combinações de populações de mosquitos e cepas virais, foram examinadas 7.251 amostras de 2417 fêmeas de mosquitos.

Quanto aos machos examinados para a investigação de eventual transmissão vertical do YFV, foram examinados 270 indivíduos, sendo 130 por inoculação de homogenatos de corpos em culturas de células C6/36 de *Ae. albopictus*, e 140 examinados por RT-PCR, sendo todos negativos (Figura, 27).

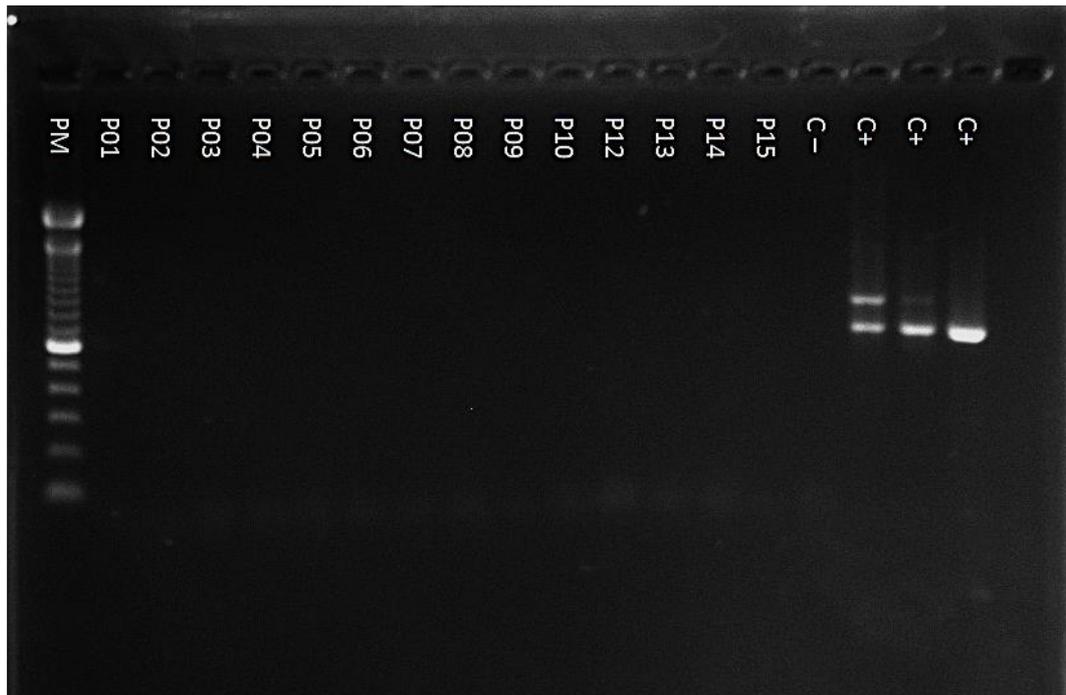


Figura 27. RT-PCR de amostras de machos de *Hg. leucocelaenus*, examinados para detecção de infecção por transmissão transovariana. PM: Peso molecular, P01 a P15: amostras de mosquitos (pools); C: controles.

Ainda que a competência vetorial fosse heterogênea no conjunto de populações de mosquitos avaliadas, nenhuma delas foi refratária a nenhuma das cepas de YFV testadas, a despeito da origem geográfica de mosquitos e vírus.

Os indicadores da competência vetorial foram determinados segundo inoculação de homogenatos de corpo e cabeça e amostras de salivas em cultura de células C6/36 de *Ae. albopictus* em placas de 96 poços e a infecção revelada por imunofluorescência indireta após cinco dias de incubação. De modo geral, os poços inoculados com homogenatos de corpo e cabeça mostravam abundante infecção viral, revelada por intensa e difusa distribuição de antígenos (Figura, 28), ao passo que os poços inoculados com amostras de saliva geralmente mostravam focos distintos de replicação viral (Figura 28).

Procuramos analisar comparativamente os indicadores de competência vetorial para YFV entre espécies de *Aedes* ocorrendo na mesma localidade e, em seguida,

entre populações da mesma espécie de *Aedes*, porém de origens diferentes, ou seja, diferentes cenários epidemiológicos, como descrito a seguir:

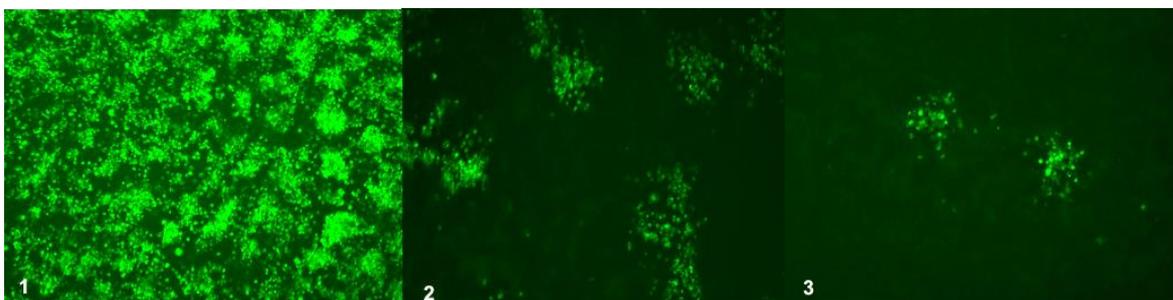


Figura 28. Imunofluorescência Indireta de cultura de células C6/36 inoculadas com amostras de homogenatos de corpo (1) cabeça (2) saliva (3), após 5 dias de incubação; focos demonstrando a replicação viral.

4.1 Disseminação e transmissão do YFV em mosquitos do gênero *Aedes*

Tomamos por base as populações de *Ae. aegypti* AE-GOI e *Ae. albopictus* AL-GOI, ou seja, coletados na região de Goiânia, no estado de Goiás, em área epidêmica/epizoótica de febre amarela, por estarem numa situação epidemiológica essencialmente intermediária entre a endêmica e livre de transmissão no Brasil. Tal como as demais populações, essas duas foram desafiadas oralmente com as três cepas do vírus (dois do Brasil (74018-1D, 1E-4408) e um do Senegal (S-79).

Ao se examinarem os mosquitos, AE-GOA estavam infectados e haviam disseminado o vírus após o 7º dias pós-infecção (dpi) e a transmissão se deu apenas ao 14º dpi (Figura 29). O mesmo foi visto para a população AL-GOE (Figura 29).

Além disso, considerando todas as populações de *Ae. aegypti* por um lado e todas as populações de *Ae. albopictus* por outro lado, modelos de regressão logística mostraram taxas de infecção semelhantes aos 14º e 21º dpi ($p=0.10$ e $p=0.73$, respectivamente). Portanto, todas as novas análises foram conduzidas considerando-

se os resultados de cada população ou espécie agrupando-se os obtidos nos 14^o e 21^o dpi.

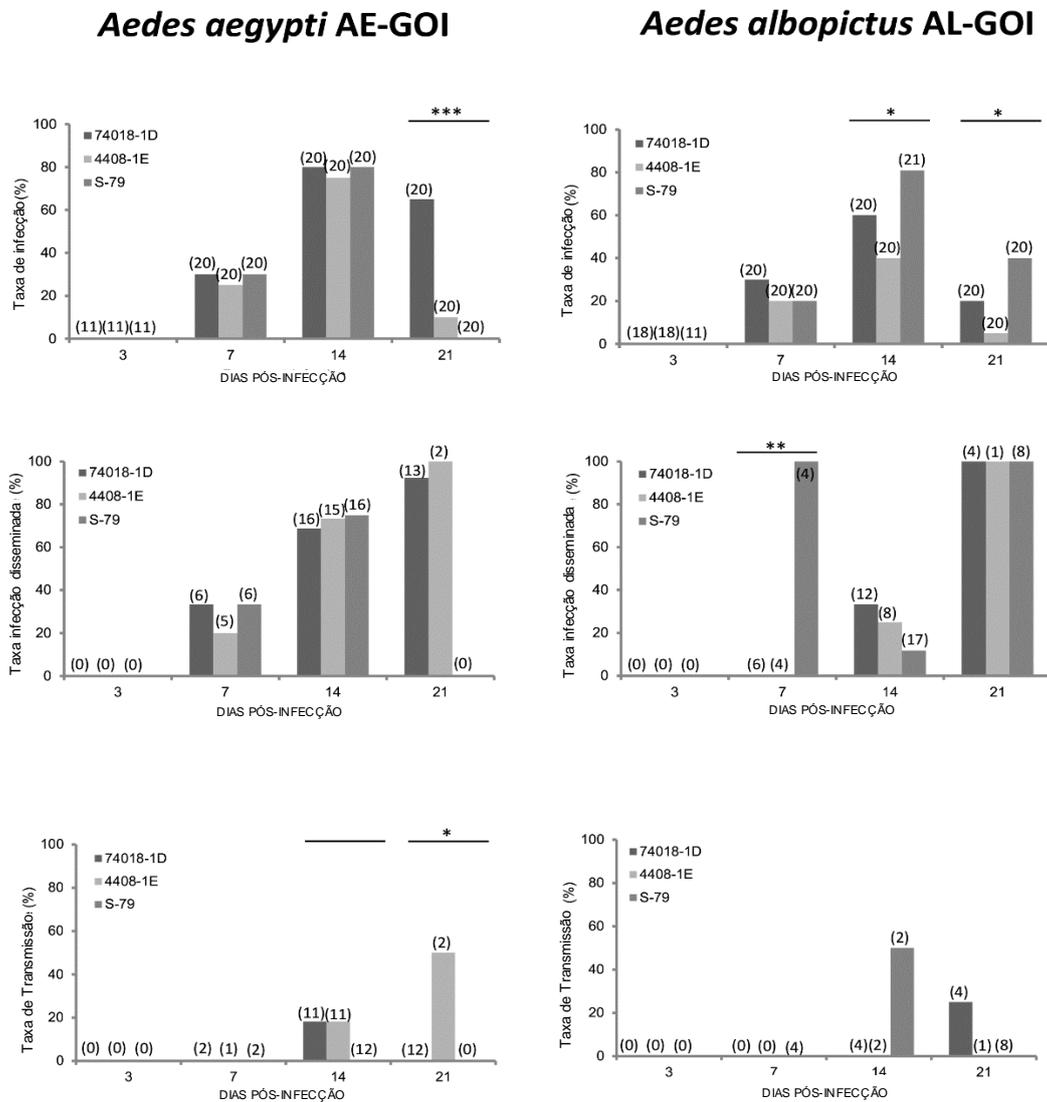


Figura 29. Competência vetorial para o vírus da febre amarela em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de diferentes cenários epidemiológicos no Brasil: Manaus (MAN), Goiânia (GOI) e Rio de Janeiro (RIO). Os mosquitos foram desafiados oralmente com título viral de 10^6 PFU/mL, incubados por 3, 7, 14 e 21 dias e processados para a determinação das taxas de infecção (TI), de disseminação (TDI) e de transmissão (TT). Os vírus usados foram 74018-1D e 4408-1E (genótipo Sul Americano I) e S-79 (genótipo Oeste da África). Asteriscos referem-se a diferenças significantes (*, $p < 0.05$, **, $p < 10^{-2}$). Entre parênteses acham-se os números de indivíduos examinados para a determinação de cada indicador.

4.2 Susceptibilidade de *Aedes aegypti* das Américas aos genótipos Sul americano I e Oeste Africano do YFV.

Três populações de *Ae.aegypti* do Brasil (AE-MAN, AE-GOI, AE-RIO) coletadas em áreas endêmica, epizootica/epidêmica e livre de febre amarela, respectivamente (Figura 30), foram infectadas experimentalmente com as três cepas virais supracitadas. Ao se analisar comparativamente as taxas de infecção viral das populações AE-MAN, AE-GOI e AE-RIO encontramos diferenças significativas para as três cepas de YFV ($p < 0.05$, Fig. 30), com valores que variam de 30% (AE-MAN infectado com S-79) para 85% (AE-RIO infectado com 4408-1E). Considerando-se cada população de *Ae. aegypti* em separado e excluindo-se a influência do tempo de incubação, a mais elevada taxa de infecção para a população de AE-GOI foi com a cepa 74018-1D, para AE-MAN foram as duas cepas brasileiras 4408-1E e 74018-1D, enquanto não foi observada diferença significativa entre as taxas de infecção na população de AE-RIO independentemente do vírus usado no teste (Tabela 2).

Aedes aegypti

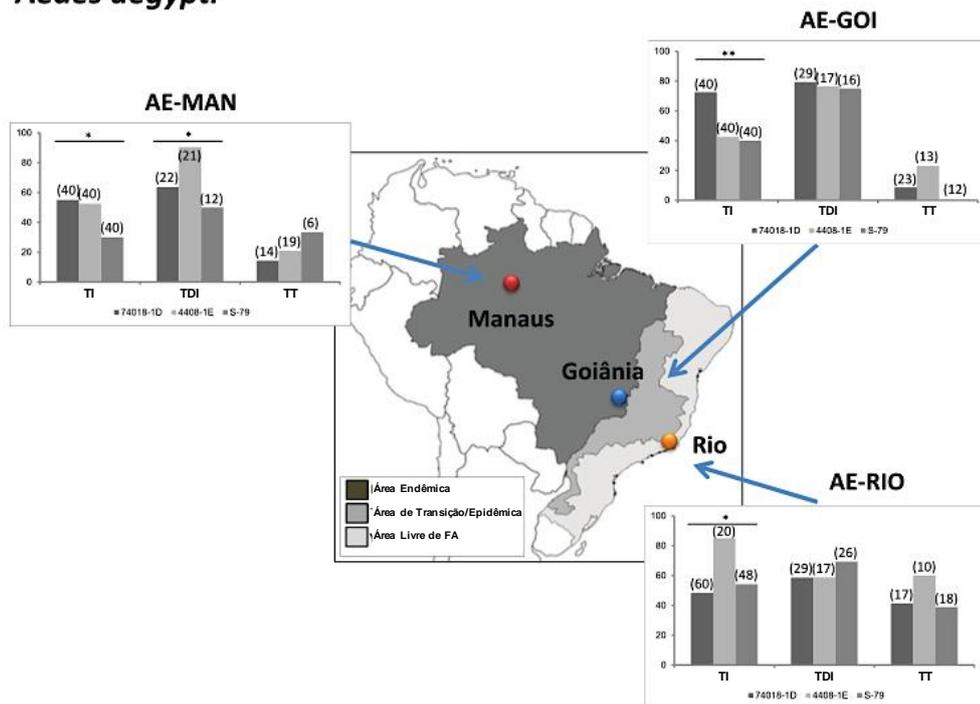


Figura 30. Competência vetorial para três cepas do vírus da febre amarela em três populações de *Aedes aegypti* provenientes de diferentes cenários epidemiológicos no Brasil: Manaus (MAN), Goiânia (GOI) e Rio de Janeiro (RIO). Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL e incubados por 21 dias. Cada mosquito foi individualmente processado para a determinação das taxas de infecção (TI), de disseminação (TDI) e de transmissão (TT). As cepas de vírus usadas foram 74018-1D e 4408-1E, do genótipo Sul Americano I, e S-79, do genótipo Oeste da África. Asteriscos referem-se a diferenças significantes (*, $p < 0.05$, **, $p < 10^{-2}$). Entre parênteses acham-se os números de indivíduos examinados para a determinação de cada indicador.

Tabela 2

Comparações de taxas de infecção para três cepas de vírus da febre amarela em mosquitos urbanos e suburbanos - *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* – do Brasil e Congo. Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL (modelo de regressão logística*).

População	Vírus	Dias pós-infecção	Espécies	
			<i>Aedes aegypti</i> (AE)	<i>Aedes albopictus</i> (AL)
Goiânia (GOI)	4408-1E	7	1	0.46 (0.26 – 0.83)
		14-21	2.58 (1.58 – 4.22)	1.19 (0.56 – 2.52)
	74018-1D	7	2.10 (1.13 – 3.91)	1.20 (0.59 – 2.42)
		14-21	5.43 (2.41 – 12.23)	3.10 (1.30 – 7.37)
	S-79	7	1.19 (0.64 – 2.21)	1.34 (0.66 – 2.70)
		14-21	3.08 (1.39 – 6.85)	3.45 (1.46 – 8.17)
Manaus (MAN)	4408-1E	7	2.87 (1.26 – 6.50)	0.32 (0.12 – 0.88)
		14-21	3.85 (1.79 – 8.24)	0.43 (0.17 – 1.08)
	74018-1D	7	2.75 (1.16 – 6.54)	0.38 (0.15 – 0.97)
		14-21	3.68 (1.67 – 8.09)	0.51 (0.23 – 1.12)
	S-79	7	1.41 (0.58 – 3.33)	0.38 (0.15 – 0.98)
		14-21	1.89 (0.84 – 4.22)	0.51 (0.22 – 1.19)
Rio de Janeiro (RIO)	4408-1E	7	5.90 (2.49 – 13.99)	0.28 (0.10 – 0.78)
		14-21	7.47 (3.20 – 17.44)	0.36 (0.13 – 0.95)
	74018-1D	7	3.28 (1.41 – 7.63)	0.19 (0.07 – 0.53)
		14-21	4.15 (1.96 – 8.79)	0.29 (0.10 – 0.61)
	S-79	7	3.64 (1.56 – 8.49)	0.42 (0.17 – 1.08)
		14-21	4.61 (2.13 – 9.98)	0.53 (0.23 – 1.26)
Congo (CON)	4408-1E	7	2.82 (1.27 – 6.25)	1.57 (0.67 – 3.82)
		14-21	2.44 (1.18 – 5.06)	1.39 (0.61 – 3.17)
	74018-1D	7	1.36 (0.55 – 3.39)	0.96 (0.41 – 2.23)
		14-21	1.18 (0.51 – 2.71)	0.83 (0.38 – 1.84)
	S-79	7	1.59 (0.65 – 3.91)	2.20 (0.99 – 4.88)
		14-21	1.38 (0.61 – 3.12)	1.91 (0.91 – 2.98)

*modelo com interação entre espécies e populações de mosquitos, entre espécies e cepas virais e entre populações de mosquitos e dias após desafio oral com o vírus.

Após a instalação da infecção do intestino, o vírus necessita se propagar para dentro da hemocele do mosquito, o que permite a sua disseminação para os tecidos secundários e avanço da infecção rumo à transmissão. A taxa de disseminação viral foi determinada pela presença de vírus nas cabeças dos mosquitos. Independentemente da população de mosquito e cepa viral, não foi observada a disseminação aos 3º dpi.

Verificamos semelhantes taxas de disseminação das cepas virais independentemente das populações de *Ae. aegypti*, exceto em AE-MAN que apresentou maior disseminação viral da cepa brasileira da linhagem atualmente circulante, ou seja, YFV 4408-1E (90,47%) (Fig. 30, Tabela 2).

Para a ocorrência da transmissão viral, após disseminar pela hemocele, o vírus deve atingir as glândulas salivares do mosquito e ser excretado com saliva expectorada pelo mosquito. A taxa de transmissão é determinada pela presença de partículas virais infectantes na saliva. Verificamos que as taxas de transmissão foram semelhantes para todas as três populações brasileiras de *Ae. aegypti* independentemente da cepa viral (YFV) ($p > 0.05$; Fig.30, Tabela 3). As taxas de transmissão foram bem mais baixas que aquelas de infecção e disseminação em *Ae. aegypti*. Estes resultados sugerem que as glândulas salivares se comportam como uma barreira mais eficiente para a transmissão do que o intestino médio para disseminação do YFV em *Ae. aegypti*. Além disso, observamos que todas as populações brasileiras do *Ae. aegypti* possuem competências similares para a transmissão das duas linhagens do YFV brasileiras: cepa 74018, da linhagem 1D, responsável por epizootias de 1998 a 2001, e da nova linhagem viral, 4408-1E, causando mortes crescentes de macacos e casos em humanos desde 2004.

Tabela 3

Comparações de taxas de disseminação para as três cepas de vírus da febre amarela em mosquitos urbanos e suburbanos - *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* – do Brasil e Congo. Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL (modelo de regressão logística*).

População	Vírus	Espécies	
		<i>Aedes aegypti</i> (AE)	<i>Aedes albopictus</i> (AL)
		OR [95% CI]	OR [95% CI]
Goiânia (GOI)	4408-1E	1	0.28 (0.14 – 0.58)
	74018-1D	1.49 (0.60 – 3.70)	0.42 (0.14 – 1.31)
	S-79	1.64 (0.64 – 4.18)	0.46 (0.16 – 1.33)
Manaus (MAN)	4408-1E	3.76 (1.16 – 12.17)	6.84 (1.38 – 33.81)
	74018-1D	1.03 (0.37 – 2.86)	1.88 (0.46 – 7.69)
	S-79	1.00 (0.31 – 3.22)	1.82 (0.48 – 6.95)
Rio de Janeiro (RIO)	4408-1E	1.43 (0.48 – 4.27)	1.36 (0.35 – 5.32)
	74018-1D	0.93 (0.35 – 2.45)	0.88 (0.23 – 3.42)
	S-79	1.08 (0.41 – 2.86)	1.03 (0.26 – 4.13)
Congo (CON)	4408-1E	6.30 (1.85 – 21.46)	5.31 (1.47 – 19.16)
	74018-1D	3.94 (0.93 – 16.65)	3.31 (0.85 – 12.95)
	S-79	1.12 (0.36 – 3.47)	0.94 (0.33 – 2.66)

*ajustado para tempo de incubação, com interação entre espécies e populações de mosquitos e também entre populações e cepas de vírus amarelo

4.3 Eficiência de *Aedes albopictus* de áreas brasileiras densamente povoadas, como o Rio de Janeiro, para transmitir experimentalmente o vírus da febre amarela

Tal como em *Ae. aegypti*, *Ae albopictus* brasileiros oriundos de área endêmica - Manaus (AL-MAN), epidêmica/epizoótica - Goiânia (AL-GOI) e livre de transmissão de febre amarela - Rio de Janeiro (AL-Rio), foram experimentalmente desafiados com três cepas do vírus da febre amarela (duas do Brasil e uma do Senegal). Quando comparamos a infecção viral, as populações de AL-MAN e AL-Rio apresentaram baixa taxa de infecção (variando de 10% para AL-RIO, desafiado pela cepa S-79, a 21,42% para AL-MAN, alimentado com sangue com a mesma cepa; $p > 0,05$; Fig. 5). Por outro lado, AL-GOI mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$), com um valor mais alto para taxa de infecção com o vírus senegalês S-79 (60,97%) (Tabela 2).

Deve-se notar também que as taxas de infecção foram significativamente menores em *Ae. albopictus* do que em *Ae. aegypti* para todas as cepas virais, exceto as fêmeas da população de Goiânia AL-GOI, quando infectados com a cepa S-79.

Quando analisamos a disseminação viral (representada por TDI nas figuras e tabelas), a população AL-GOI apresentou valores baixos para disseminação. Entretanto valores altos de taxa de transmissão foram observados na população de *Ae. albopictus* do Rio de Janeiro e valores mais elevados ainda na população de AL-MAN (Fig.31, Tabela 3). Todas as três populações brasileiras de *Ae. albopictus* mostraram valores similares ($p>0.05$) para as três cepas do vírus da febre amarela, apesar haver tendência a ser mais elevados de disseminação com a cepa viral 1E na população de AL-MAN (Tabela 3). Com efeito, os mais altos valores de TDI foram obtidos para as populações AL-MAN e AL-RIO

Curiosamente, as taxas de disseminação foram similares entre *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* de Manaus e do Rio; enquanto que em fêmeas de mosquitos da população de Goiás, a disseminação foi significativamente menor na população de *Ae. albopictus* e do que na população de *Ae. aegypti* (Tabela 2).

Quando se considera a transmissão viral descrito pela taxa de transmissão do vírus na saliva, a população AL-MAN apresentou altos valores da taxa de transmissão baseados nos tamanhos baixos das amostras (66,67% (N=6) com 74018-1D e 50% (N=4) com 4408-1E) e, surpreendentemente, esta população não foi capaz de transmitir a YFV S-79 da África.

A população AL-GOI, portanto, oriunda de áreas de emergência (epizootica/epidêmica) revelou similaridade nas taxas de transmissão para as três cepas do vírus ($p > 0,05$), embora a essa população (AL-GOI) fosse menos eficiente para transmitir YFV do que a população AL-RIO (Figura 31).

Aedes albopictus

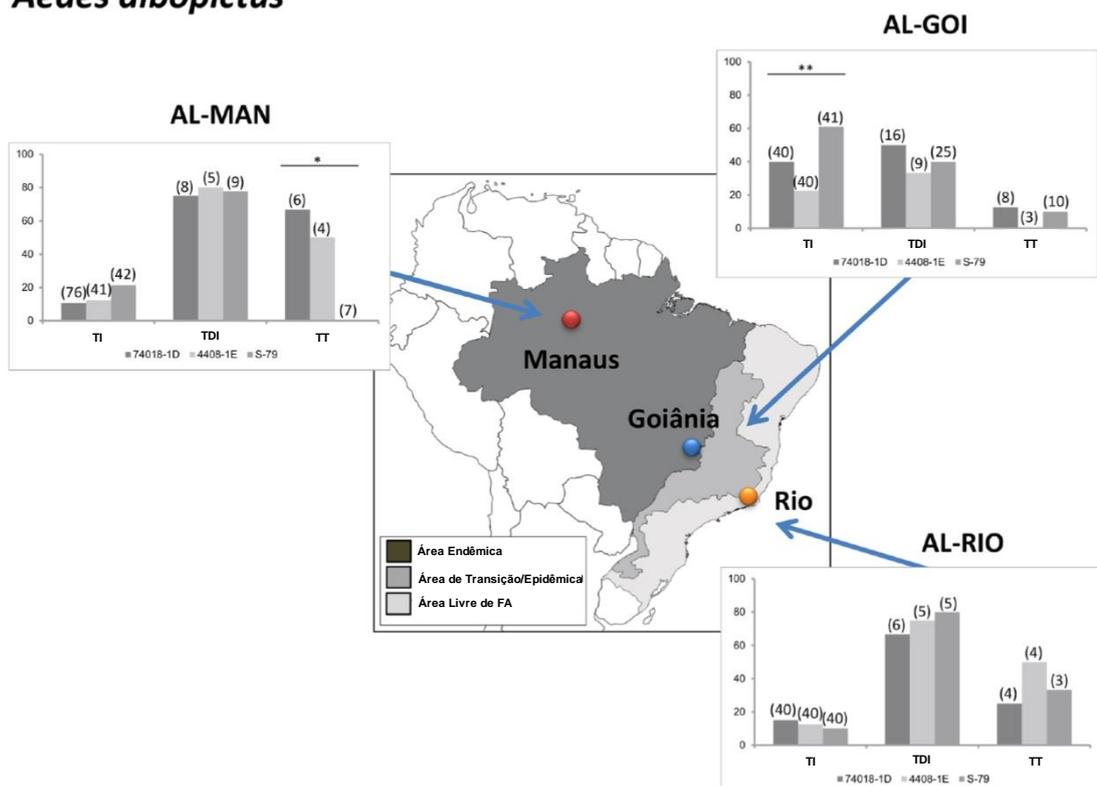


Figura 31. Competência vetorial para três cepas do vírus da febre amarela em três populações de *Aedes albopictus* provenientes de diferentes cenários epidemiológicos no Brasil: Manaus (MAN), Goiânia (GOI) e Rio de Janeiro (RIO). Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL e incubados por 21 dias. Cada mosquito foi individualmente processado para a determinação das taxas de infecção (TI), de disseminação (TDI) e de transmissão (TT). As cepas de vírus usadas foram 74018-1D e 4408-1E, do genótipo Sul Americano I, e S-79, do genótipo Oeste da África. Asteriscos referem-se a diferenças significantes (*, $p < 0.05$, **, $p < 10^{-2}$). Entre parênteses acham-se os números de indivíduos examinados para a determinação de cada indicador.

Em suma, nossos resultados sugerem, portanto, que *Ae. albopictus* das populações AL-RIO e AL-MAN compartilham o mesmo padrão de infecção, disseminação e transmissão do YFV, ou seja, apresentam baixas taxas de infecção, altas taxas de disseminação e altos valores na taxa de transmissão. Esses dados também sugerem papel importante do intestino médio como a principal barreira na trajetória do vírus para as glândulas salivares nessas populações de *Ae. albopictus*. Curiosamente, o AL-GOI foi menos permissiva ao vírus da febre amarela do que as outras duas populações de *Ae. albopictus*. Finalmente, e a despeito das diferenças nas taxas de transmissão, observamos que, tal como em *Ae. aegypti* brasileiros testados, os mosquitos *Ae. albopictus* brasileiros foram capazes transmitir tanto a linhagem antiga do YFV (74018 – linhagem 1D) e quanto a nova linhagem viral (4408, linhagem 1E) (Tabela 3).

Tabela 4

Comparações de taxas de transmissão para as três cepas de vírus da febre amarela em mosquitos urbanos e suburbanos - *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* – de Brazaville, Congo. Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL (modelo de regressão logística*).

	OR (95% CI)	P
Espécies		
<i>Aedes aegypti</i> (AE)	1	0.95
<i>Aedes albopictus</i> (AL)	0.98 (0.52 – 1.83)	
Populações		
Congo (CON)	6.97 (2.75 – 17.65)	<0.001
Goiânia (GOI)	1	
Manaus (MAN)	2.63 (0.97 – 7.10)	
Rio de Janeiro (RIO)	7.93 (3.08 – 20.39)	
Cepa do Vírus		
4408-1E	1	0.14
74018-1D	0.70 (0.36 – 1.38)	
S-79	0.49 (0.24 – 1.00)	
Dias pós-infecção oral		
7	1	<0.001
14-21	13.98 (4.12 – 47.48)	

*Nenhuma interação significativa

4.4 Susceptibilidade de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* provenientes de um país africano endêmico de febre amarela – Congo – às cepas Americana e Africana do YFV.

Para testar se *Ae. aegypti* (AE-CON) e *Ae. albopictus* (AL-CON) do Congo eram competentes para transmitir cepas do YFV brasileiras e do Oeste Africano, amostras de colônias desses dois mosquitos foram desafiadas oralmente com as três cepas de YFV.

A população de AE-CON e AL-CON mostraram taxas de infecção variando entre 25% (quando infectado com o vírus brasileiro 74018-1D) e 38,6% (quando infectados com brasileiro 4408-1E). Independentemente da cepa viral, as taxas de infecção não foram diferentes entre o AE-CON e AL-CON ($p > 0,05$; Tabela 1).

No que se refere à disseminação viral, as populações de AE-CON e AL-CON mostraram taxas muito maiores do que as fêmeas co-específicas das outras populações, ou seja, do Brasil (Fig.32). E, curiosamente, as cepas virais americanas levaram à disseminação significativamente maior do que a cepa africana tanto para *Ae. aegypti* (AE-CON) quanto para *Ae. albopictus* (AL-CON) ($p < 0,05$). Não observamos diferença entre as TDI mostradas por AE-CON e AL-CON ($p = 0.72$).

A taxa de transmissão viral foi ligeiramente inferior, exceto quando *Ae. aegypti* (AE-CON) e *Ae. albopictus* (AL-CON), infectados com a cepa brasileira 4408-1E do YFV (73.33%). Por outro lado, AL-CON apresentou padrões ligeiramente semelhantes ao de AE-CON quando desafiados com a cepa de YFV do Oeste da África (S-79), ou seja: taxa de infecção mais baixa, 31,37%, e TDI superior, 68,75%; enquanto as taxas de transmissão não diferiram significativamente ($p > 0,05$), variando de 36.36% para a cepa Africana do YFV (S-79) a 50% (cepa brasileira 74018-1 D).

Assim, em suma, as populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* do Congo (Brazzaville) apresentaram índices de competência vetorial essencialmente semelhantes quando desafiadas oralmente com cepas do YFV pertencentes a ambos os genótipos, Sul-americano I e África Ocidental.

CONGO-BRAZZAVILLE
(VETORES URBANOS)

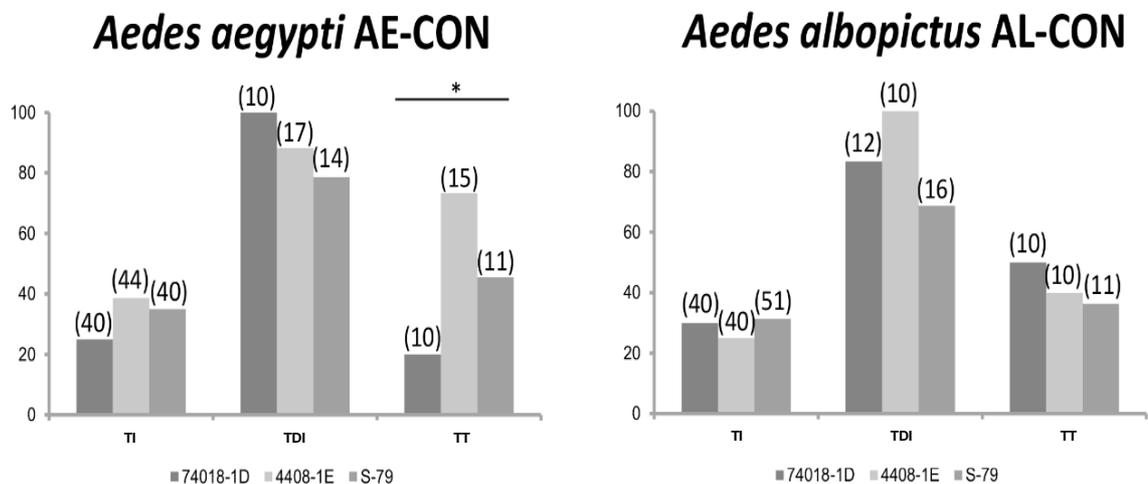


Figura 32. Competência vetorial para três cepas do vírus da febre amarela em mosquitos urbanos – *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* – de Brazzaville, Congo. Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL. Cada mosquito foi individualmente processado para a determinação das taxas de infecção (TI), de disseminação (TDI) e de transmissão (TT). As cepas de vírus usadas foram 74018-1D e 4408-1E, do genótipo Sul Americano I, e S-79, do genótipo Oeste da África. Asteriscos referem-se a diferenças significantes (*, $p < 0.05$). Entre parênteses acham-se os números de indivíduos examinados para a determinação de cada indicador.

4.5 Competência de mosquitos silvestres - *Haemagogus* e *Sabethes* - da população do Rio de Janeiro para transmitir as cepas brasileiras e africana do vírus da febre amarela.

Investigamos se duas espécies de mosquitos silvestres que participam de ciclos enzoóticos do YFV no Brasil, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus*, seriam tão sensíveis quanto os mosquitos urbanos e suburbanos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, quando desafiados oralmente com as três cepas do vírus.

Os resultados revelaram que ambas as espécies dos mosquitos silvestres fluminenses apresentaram padrões de infecção semelhantes ao do mosquitos vetor clássico da febre amarela urbana, *Ae. aegypti*, enquanto *Ae. albopictus* foi significativamente menos infectados (como descrito nos parágrafos anteriores).

Em geral, a disseminação ocorreu em média em 64,3% dos mosquitos silvestres fluminenses. Esta taxa de disseminação não foi diferente ($p = 0,34$) entre as quatro espécies testadas (*Hg. leucocelaenus*, *Sa. albiprivus*, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) e entre as três cepas do vírus ($p = 0,14$). Quanto à transmissão, essa foi observada em 36,6%, não sendo diferente entre as quatro espécies ($p = 0,85$), nem entre as três cepas vírus ($p = 0,95$).

Descrevendo-se mais detalhadamente os indicadores da competência nos mosquitos silvestres fluminenses, verificamos que as taxas de infecção foram superiores a 48%, as taxas de disseminação e transmissão superiores a 44% e a 40%, respectivamente, sugerindo um papel limitado de barreiras ao YFV na sua rota migratória no corpo dessas espécies de mosquitos, seja no intestino médio ou nas glândulas salivares.

BRASIL - RIO
(Vetores Silvestres)

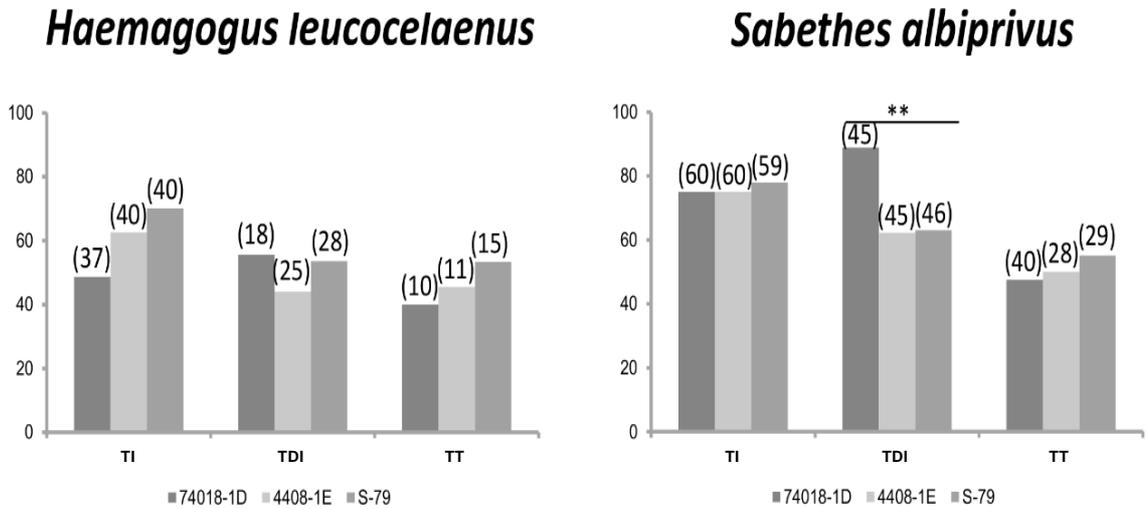


Figura 33. Competência vetorial para o vírus da febre amarela em mosquitos silvestres brasileiros - *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus*. Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL. Cada mosquito foi individualmente processado para a determinação das taxas de infecção (TI), de disseminação (TDI) e de transmissão (TT). As cepas de vírus usadas foram 74018-1D e 4408-1E, do genótipo Sul Americano I, e S-79, do genótipo Oeste da África. Asteriscos referem-se a diferenças significantes (**, $p < 10^{-2}$). Entre parênteses acham-se os números de indivíduos examinados para a determinação de cada indicador.

Quando os mosquitos silvestres fluminenses com saliva infecciosa foram considerados a partir do número inicial de fêmeas testadas (e não somente do número em que se detectou disseminação viral), a eficiência de transmissão (TE) variou de 10,81% a 20% para *Hg. leucocelaenus* e de 23,33 a 31,66% para *Sa. albiprivus* (Figuras 32, 33 e 34). Assim, vetores enzooticos de febre amarela do Brasil demonstraram ser altamente competentes para transmitir o vírus de cepas do Brasil, bem como a cepa do Oeste africano.

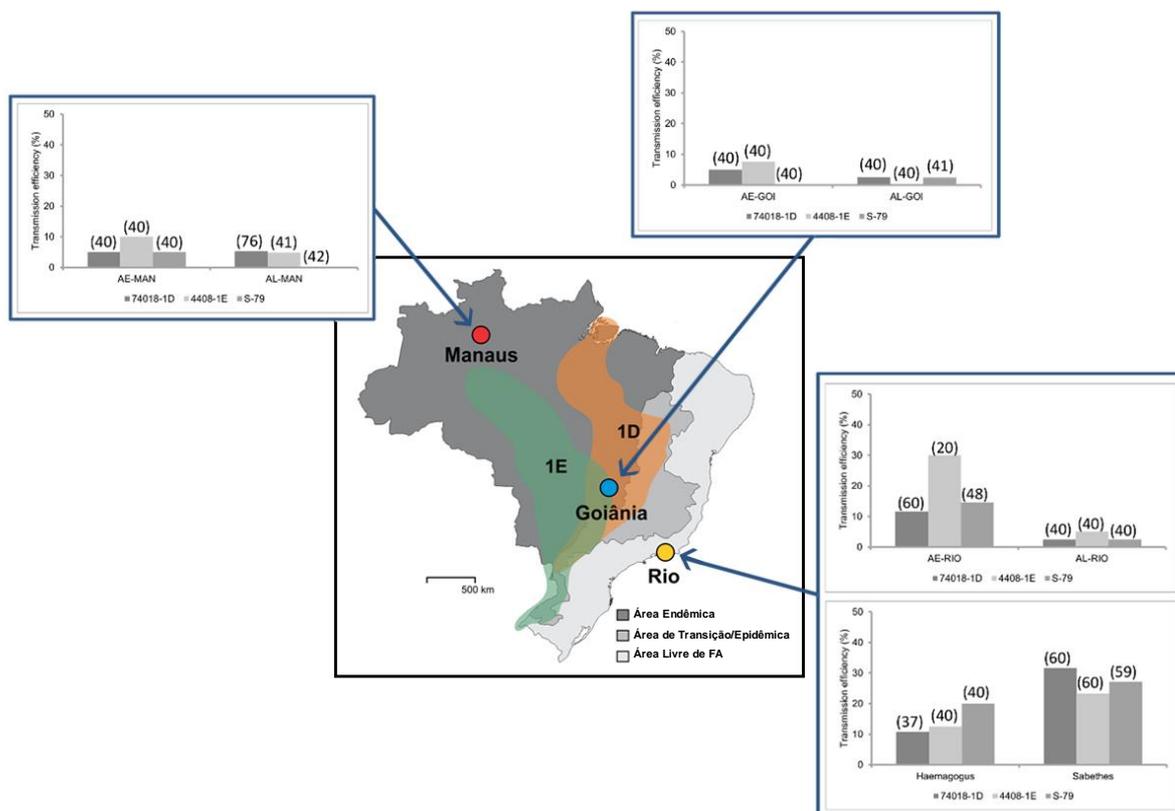


Figura 34. Comparação eficiência para a transmissão para o vírus da febre amarela em mosquitos brasileiros silvestres - *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus* – e urbanos – *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os mosquitos foram desafiados oralmente com um repasto sanguíneo contendo título viral de 10^6 PFU/mL e incubados por 21 dias. A eficiência da transmissão corresponde à proporção de mosquitos com saliva positiva dentre o número inicial de mosquitos desafiados oralmente. As cepas de vírus usadas foram 74018-1D e 4408-1E, do genótipo Sul Americano I, e S-79, do genótipo Oeste da África. Entre parênteses acham-se os números de indivíduos examinados para a determinação de cada indicador.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados apontam que as populações de mosquitos urbanos e suburbanos - *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, procedentes de área até muito recentemente livre da febre amarela no Brasil, o Rio de Janeiro, são tão suscetíveis e competentes para transmitir as três cepas do YFV quanto seus homólogos de área tradicionalmente endêmica, Manaus, na Amazônia, quando desafiadas oralmente.

Ainda, nossos estudos mostraram que as populações desses mesmos mosquitos - *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, porém de região epizoótica/epidemia, representada por arredores de Goiânia, Centro-Oeste, foram bem menos competentes para transmitir o vírus amarílico que aquelas de áreas endêmica e indene. Esse resultado sugere ser menos provável que *Ae. albopictus* e, em menor medida, o *Ae. aegypti*, venham a desempenhar ativamente o papel de vetor-ponte entre o ciclo silvestre e urbano numa zona de emergência de febre amarela como o Centro-oeste brasileiro, ainda que não se possa excluir tal possibilidade. Porém, preocupantemente, a recíproca parece verdadeira no caso de re-eremergência no Rio de Janeiro e Manaus dada a permissividade dos mosquitos urbanos locais a três linhagens virais testadas. Resta saber se o desafio oral dessas populações fluminenses de mosquitos com a sub-linhagem do YFV circulante na epidemia disseminada no Sudeste, em 2016-2017 (Bonaldo *et al.* 2017, Mir *et al.* 2017)

Desde quando a principal espécie vetora do YFV no mundo, o *Ae. aegypti*, foi erradicada do Brasil, em 1957 (Soper 1963, Franco 1969), a transmissão do vírus tem sido mantida em um ciclo silvestre na Amazônia e no Centro-Oeste, de onde ondas de epizootias ocorrem intermitentemente com intervalos de, em média, 6-10 anos, coincidindo provavelmente com a renovação das populações de primatas não humanos não imunes ao vírus (Vasconcelos 2003). Coincidentemente, a reintrodução

e disseminação do *Ae. aegypti* e a invasão e estabelecimento do *Ae. albopictus* no Brasil, essencialmente nas décadas de 1970-1980, deu-se num momento em que o território de transmissão do YFV se expandiu, paulatinamente, no Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste, com epizootias em novas áreas dos estados de Mato Grosso, da Bahia, de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente (Vasconcelos 2010). No início dos anos 2000, várias epizootias e epidemias foram registradas no Sudeste, como em Minas Gerais, provocadas por uma linhagem nova, denominada 1D (Vasconcelos 2010, Vasconcelos *et al.* 2004). Em 2008-2009, um surto YFV acometeu o Rio Grande do Sul e São Paulo (Cardoso *et al.* 2010, Romano *et al.* 2014), tendo sido causado por uma nova linhagem 1E do vírus substituindo a linhagem antiga 1D (de Souza *et al.* 2010, Nunes *et al.* 2012).

No presente estudo, mostramos que as populações brasileiras de vetores urbanos, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, bem como vetores silvestres, *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus*, foram similarmente susceptíveis e competentes para transmitir das duas últimas linhagens do YFV circulantes no Brasil, ou seja, 1D e 1E. Esse dado, descartaria a hipótese das diferenças na competência vetorial dos mosquitos brasileiros como causa da substituição das linhagens viral.

Hg. leucocelaenus é provavelmente a espécie silvestre enzoótica e acrodendrofílica dominante nas florestas próximas a cidade do Rio de Janeiro (Alencar *et al.* 2016), ao lado de *Ae. albopictus*, espécie invasora que consegue igualmente colonizar sítios suburbanos e parte da floresta no Rio de Janeiro (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2002, Maciel-de-Freitas *et al.* 2006). Observamos que *Hg. leucocelaenus*, assim como *Sa. albiprivus*, foram altamente susceptíveis a todas as três cepas de YFV. De fato, ambos os mosquitos foram capazes de transmitir indiferentemente as duas variedades de cepa do YFV do genótipo Sul Americano testadas, a antiga linhagem 1D e a nova linhagem viral 1E, bem como a cepa da África Ocidental, representada

por um vírus isolado do Senegal em 1979. Tais resultados experimentais corroboram seu papel já comprovado como vetores primários de YFV de áreas enzoóticas. *Sa. albiprivus* já foi encontrado naturalmente infectado com o vírus amarelo na Argentina, tratando-se de mosquito acrodendrofílico, que se cria em buracos de árvore e que pode picar humanos mesmo ao nível do solo dentro da mata (Goenaga *et al.* 2012). Este sabetíneo tem vasta distribuição de Norte a Sul no continente sul-americano, tendo a sua ocorrência sido registrada na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai e Suriname (Walter Reed Biosystematic Unit 2016).

Hg. leucocelaenus tem criadouros e também hábitos semelhantes aos descritos para *Sa. albiprivus*, o que permite atacar primatas não-humanos e humanos, respectivamente, na copa e nível do solo (Shannon *et al.* 1938, Arnell 1973, Guimarães *et al.* 1985, 1987, Dégallier *et al.* 1992, Chadee *et al.* 1997, Tubaki *et al.* 2010, Lira-Vieira *et al.* 2013). Além deste aspecto comportamental favorável à transmissão do YFV dentro do ambiente silvestre, *Hg. leucocelaenus* pode voar longas distâncias entre manchas isoladas, ligando-as sob o ponto de vista da transmissão. E, ao atravessar áreas modificadas e abertas, como pastos e plantações, podem picar humanos à céu aberto, particularmente no ecotone entre a franja da mata e o ambiente antrópico (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Causey *et al.* 1950, Alencar *et al.* 2013). Por exemplo, *Hg. leucocelaenus* pode, com frequência, picar humanos tanto dentro de matas primárias ou secundárias quanto nos arredores das casas localizadas a certa distância das matas (Pinheiro *et al.* 1972, Alencar *et al.* 2013). Em conjunto, todos esses padrões comportamentais exibidos por *Hg. leucocelaenus* favorecem a transmissão de arbovírus zoonóticos por este mosquito a humanos. De fato, *Hg. leucocelaenus* tem provado desempenhar papel importante na transmissão da febre amarela Silvestre, assim como de outras arboviroses infectantes para humanos em grande parte da América (Arnell 1973, Dégallier *et al.* 1992, Kumm e Cerqueira 1961,

Karabatsos 1985). Especificamente em relação à febre amarela, este mosquito tem sido incriminado como vetor primário nas epidemias recentes no Sul e Sudeste do Brasil (Cardoso *et al.* 2008, Souza *et al.* 2009). Além disso, *Hg. leucocelaenus* tem uma vasta distribuição geográfica no continente Americano, ocorrendo do Panamá ao Norte da Argentina e Uruguai (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela), fazendo com que cubra essencialmente todo o território de transmissão do YFV no continente (Arnell 1973, Walter Read Biosystematic Unit 2016).

A grosso modo, o padrão de infecção, disseminação e transmissão experimental do YFV exibidos pelos mosquitos silvestres acima descrito foi semelhante ao observado nas populações das espécies urbanas *Ae aegypti* e *Ae. albopictus* procedentes do Congo (Brazzaville), atuando como vetores urbanos potenciais na África Central (Barret and Higgs 2007). Ou seja, populações congolenses de ambas as espécies podem desencadear epidemias no ambiente urbano e peri-urbano na África Central.

No que diz respeito ao Brasil, a epidemia de febre amarela iniciada nos meses finais de 2016, provavelmente em Minas Gerais (Ministério da saúde 2017; <http://www.who.int/csr/don/27-january-2017-yellow-fever-brazil/en/>), rapidamente se aproximou do litoral Sudeste, chegando, no final do primeiro trimestre, às portas de uma das zonas mais densamente povoada, em toda América do Sul (Figuras 33 e 34). É na costa Atlântica dessa região brasileira onde está localizada a grande área metropolitana de Vitória, no ES, compreendendo sete municípios, com uma população de cerca de 1.884.100 habitantes, e, sobretudo, a do Rio de Janeiro, esta última compreendendo 21 municípios formadores das chamadas Grande Rio Fluminense e Grande Niterói, com cerca de 12.330.100 habitantes. Somente a cidade do Rio de Janeiro possui cerca de 6,5 milhões de habitantes. Como esta área não registava

circulação do YFV há cerca de 70 anos, estava, a até poucos meses, fora da área indicada para vacinação (Romano *et al* 2014), o que implica numa baixa cobertura vacinal contra o vírus nesta zona.

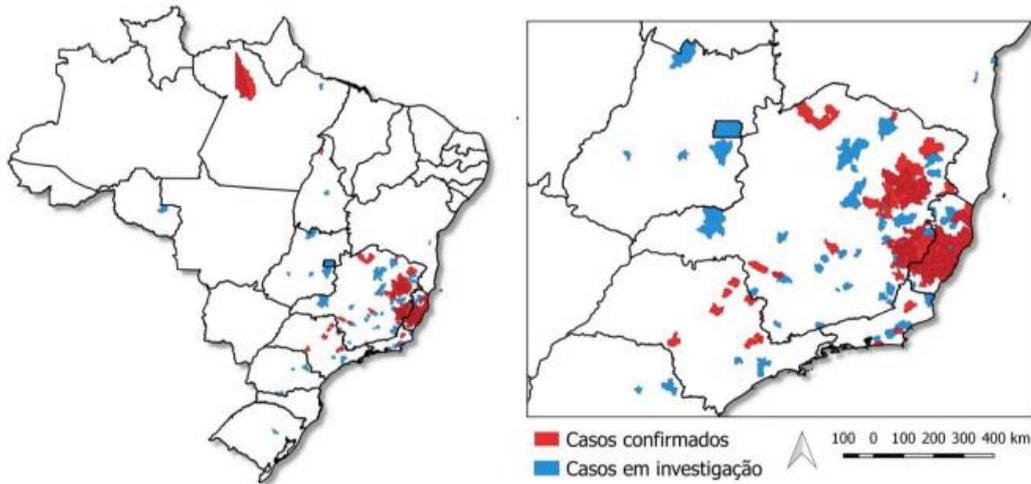


Figura 35. Distribuição geográfica dos casos humanos suspeitos de febre amarela notificados ao Ministério da Saúde, entre 1 dezembro de 2016 e 10 de maio de 2017. Fonte: Ministério da Saúde (<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/12/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-40---Atualiza----o-em-11maio2017.pdf>).

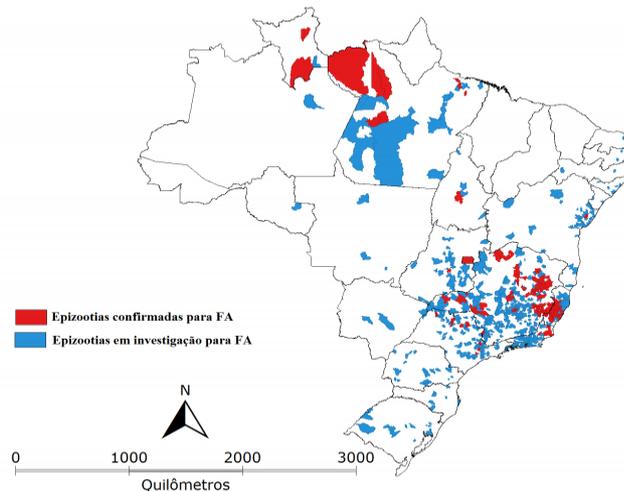


Figura 36. Distribuição das epizootias, confirmadas laboratorialmente e suspeitas, de febre amarela no Brasil, de 1 de dezembro de 2016 a 10 de maio de 2017. Fonte:

Ministério da Saúde (<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/12/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-40---Atualiza----o-em-11maio2017.pdf>).

Se quando iniciamos este estudo toda esta faixa litorânea do Sudeste, em especial o Rio de Janeiro, era área indene de febre amarela, os primeiros meses de 2017 viram uma expansão epizoótica e epidêmica se disseminar do nordeste de Minas Gerais, em especial através da bacia do rio Doce, para o oeste espírito-santense. Rapidamente, se alastrou pelo ES, com registros de óbitos e, em março, já se detectaram os primeiros casos humanos e epizootias no estado do Rio de Janeiro. A Figura 35 mostra a evolução temporal da epidemia de febre amarela no estado do Sudeste, onde se contata o início precoce no estado de MG, como também em SP, mas com maior intensidade de transmissão no primeiro, e o seu deslocamento para o ES e, mais tardiamente para o RJ.

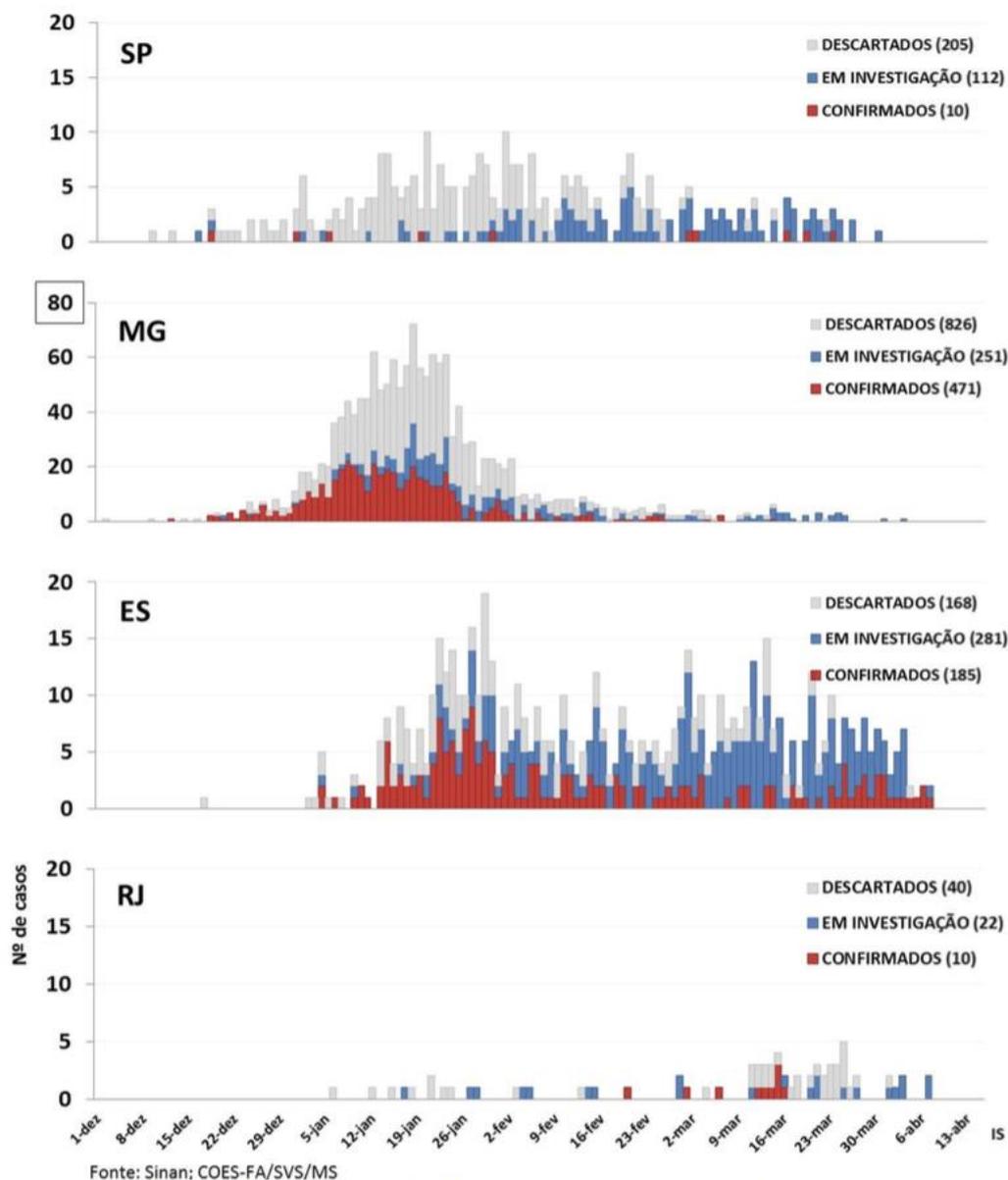


Figura 37. Distribuição temporal dos casos humanos de febre amarela notificados ao Ministério da Saúde pelos estados do Sudeste, de dezembro de 2016 a 10 de maio de 2017. Fonte: Ministério da Saúde (<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/mayo/12/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-40---Atualiza----o-em-11maio2017.pdf>).

Desde março de 2017, epizootias passaram a ser detectadas no estado do Rio de Janeiro, inicialmente em municípios do norte fluminense, com grande expansão na notificação em municípios em várias regiões do estado em abril (Figura 36). Neste

último mês, foi diagnosticado o primeiro caso de febre amarela na área metropolitana do Rio de Janeiro, numa área semi-rural no município de Maricá, a apenas 54km da capital do estado (<http://www.saude.rj.gov.br/noticias/2017/04/ses-inclui-marica-na-lista-de-municipios-prioritarios-para-vacinacao-contra-febre-amarela>).

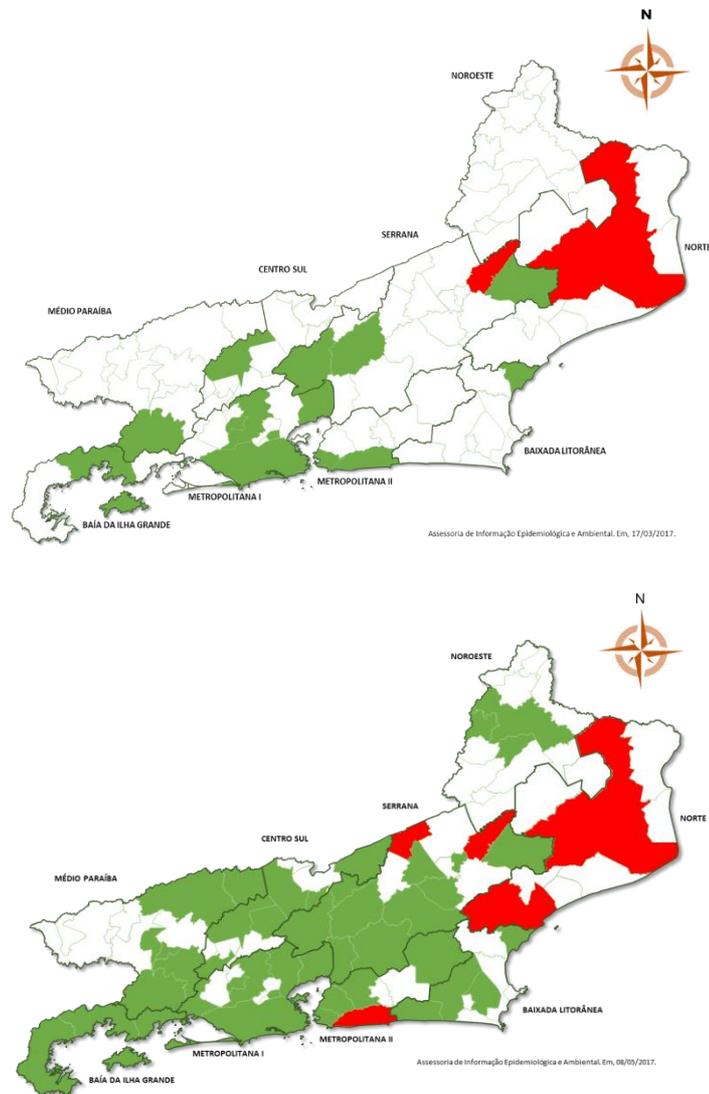


Figura 38. Progressão espacial das epizootias pelo vírus da febre amarela nos municípios do Estado do Rio de Janeiro, assinalando aqueles com epizootias em investigação (verde) e confirmadas (vermelho), em março (acima) e o acumulado até final de abril (abaixo). Fonte: SES-RJ (gentilmente cedido por Mário Sergio Ribeiro).

Até o dia 10 de maio de 2017, o estado do Rio de Janeiro tinha 12 casos confirmados de febre amarela (<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/12/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-40---Atualiza----o-em-11maio2017.pdf>), sete dos quais adquiriram a infecção no município da baixada litorânea de Casemiro de Abreu (<http://radioagencianacional.ebc.com.br/geral/audio/2017-05/macae-confirma-12o-caso-de-febre-amarela-no-estado-do-rio-de-janeiro>).

Até o momento, todos os casos humanos tiveram como local provável de infecção o ambiente rural, em proximidade com florestas. Contudo, em MG, ES e RJ, há grande interseção entre os locais prováveis de infecção pelo YFV e o território de ocorrência principalmente de *Ae. albopictus*, mas também de *Ae. aegypti*. Nesta região e em outras partes do Brasil, *Ae. albopictus* coloniza as áreas circundantes do ambiente urbano onde *Ae. aegypti* é o vetor primário de outros arbovírus patogênicos para humanos (dengue, chikungunya e Zika). Mas as suas distribuições espaciais se sobrepõem, como demonstrado por Braks *et al.* (2003), ocorrer no Rio de Janeiro. Ao mesmo tempo, *Ae. albopictus* também invade o ambiente natural, sobrepondo sua distribuição àquela de mosquitos vetores do YFV, como *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus*, podendo se movimentar entre a mata e o arredor das casas e vice-versa, tendo a chance de se alimentar em humanos e animais silvestres, como também demonstrado no Rio de Janeiro (Lourenço-de-oliveira *et al.* 2002, Maciel-de-Freitas *et al.* 2006, Alencar *et al.* 2016).

No presente estudo, populações de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* de áreas endêmica, epizootica/epidemia e livre de YFV, tiveram sua competência vetorial comparadas quanto à sua capacidade de se tornarem infectadas, disseminar e transmitir o YFV. Como esperado, mostramos que as duas espécies de mosquitos transmitem YFV com cerca de duas semanas após um repasto infectante (Vazeille *et al.* 2013). Seja do estado do Rio de Janeiro até muito recentemente indene ou da

Amazônia endêmica, as populações destes mosquitos foram mais competentes a transmitir os dois isolados de YFV do genótipo Sul-americanos (74018-1D, 1E-4408) e uma cepas Africana (S-79) que os mosquitos da área epizootica/epidemia (ou seja, Goiânia). Estas duas regiões geograficamente distantes estão conectadas por uma região de emergência onde os mosquitos também são suscetíveis à infecção pelo YFV. De fato, *Ae. albopictus*, bem como a *Ae. aegypti*, de Goiânia são capazes de eliminar partículas infectantes na saliva após a infecção pelas três cepas YFV testadas, mas com muito menos eficiência. Contudo, é sabido que populações vetoras pobremente competentes na transmissão em caráter experimental podem desempenhar importante papel na transmissão natural se algumas condições biológicas e comportamentais são reunidas, tais como elevada densidade populacional do vetor, alta taxa de picadas em humanos e elevada taxa de sobrevivência diária. Em 1987, a Nigéria registrou epidemia em áreas de onde a população de *Ae. aegypti* apresentava baixa competência para transmitir o YFV, fenótipo que aparentemente foi compensado pela densidade elevada do vetor (Miller *et al.* 1989).

Tem sido sugerido que tanto o comércio ilegal de animais silvestre, mas, principalmente, o movimento de populações humanas contribuem extensivamente para dispersão YFV (Vasconcelos *et al.* 2004, Bryant *et al.* 2007). Algumas barreiras ambientais/ecológicas inibindo movimentos de vetores e hospedeiros podem ser fatores que restringem a emergência de ciclos urbanos a partir de ciclo silvestre do YFV. Durante o processo de erradicação da febre amarela urbana do Brasil, Whitman e Antunes (1938) ressaltaram que a disseminação da febre amarela da floresta para os centros urbanos era bem menor que a expectativa. No entanto, estas barreiras tornaram-se cada vez mais frágeis no Brasil, em especial no Sudeste e Amazônia,

com crescimento da população humana e com as cidades cada vez mais perto de florestas onde o YFV pode ser enzoótico ou epizoótico.

Além disso, por causa da perda e degradação dos seus habitats naturais e por sua alta capacidade e propensão em explorar novos ambientes, PNH, tais como saguis (especialmente *Callithrix* spp) e macacos-pregos (especialmente *Sapajus* spp e *Cebus* spp) têm intensamente invadido áreas urbanas e suburbanas do Rio de Janeiro e outras cidades com elevada densidade demográfica humana da faixa Atlântica do Sudeste e Nordeste (Oliveira *et al.* 2012, Teixeira *et al.* 2015). Esses invasores urbanos colonizam largas áreas em torno e dentro das cidades, incluindo manchas de florestas onde pode ocorrer o ciclo silvestre do YFV e onde seus vetores silvestres (*Haemagogus* e *Sabethes*) ou mosquitos peri-urbanos susceptíveis, como o *Ae. albipictus*, podem ser abundantes (Alencar *et al.* 2016). Dão-se, portanto, várias intercessões territoriais e ecológicas, entre espécies de mosquitos potenciais vetores e entre estas e PNH (Figura 37). Considerando-se todas estas condições favoráveis, é difícil entender porque a febre amarela ainda não se reurbanizou no Brasil, em especial no Sudeste, onde a cobertura vacinal é ainda baixa.

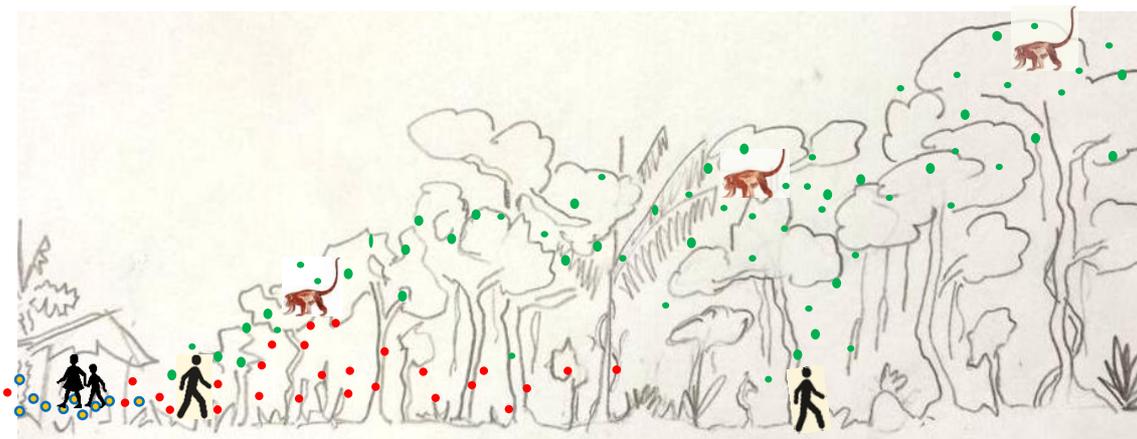


Figura 39. Representação esquemática de potenciais intercessões da distribuição espacial de mosquitos nos ambientes modificado e florestal e interações ecológicas, ilustrando possibilidades de infecção em humanos e subsequente re-emergência da febre amarela urbana a partir de epizootias. Os pontos coloridos representam diferentes mosquitos: verde, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus*, vermelho, *Ae. albopictus*, e amarelo, *Ae. aegypti*.

O surgimento da epidemia de YFV, em Angola, em janeiro de 2016, exemplifica bem como o YFV se espalha rapidamente para fora de um foco histórico a partir de movimentação humana. A partir de Luanda, onde YFV causou mais de 300 casos humanos, o vírus atingiu os países vizinhos, como a República Democrática do Congo (RDC), em março de 2016, e a Uganda, em abril de 2016 (Woodall e Yuill 2016, Kraemer *et al.* 2016). A maioria dos casos foram registrados nas cidades, sugerindo que a transmissão implicava vetores urbanos, principalmente o *Ae. aegypti*. Casos importados de Angola foram confirmados mais tarde na China (Ling *et al.* 2016), sublinhando o risco de propagação do YFV para fora da África, para países infestados por *Aedes* através de viajantes não-imunizadas.

No Rio de Janeiro, todas as populações ensaiadas das quatro espécies de mosquito - *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus* - foram

altamente suscetíveis às cepas brasileira bem como a do oeste africano do YFV. Só na sua capital, Rio de Janeiro, vivem 6,5 milhões de pessoas e para lá convergem cerca de 26 milhões de turistas estrangeiros e brasileiros através de seus aeroportos e mais 19 milhões anualmente via estradas de rodagem (<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=330455>). Partindo-se desse conjunto de dados e dos nossos resultados, é plausível imaginar que se o YFV é introduzido na grande área Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro a partir de um virêmico, seja um viajante procedente de um foco da África ocidental ou um paciente infectado no ciclo silvestre nas cercanias, estabelecem-se oportunidades para se iniciar uma transmissão vetorial do YFV. Ela pode ser desencadeada por mosquitos antropofílicos como o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, cujas populações locais são altamente suscetíveis ao YFV. Portanto, deve-se considerar fortemente a vacinação dos viajantes que visitam o Rio de Janeiro e outras localidades na costa Atlântica do Sudeste brasileiro para limitar o risco de introdução do vírus de países endêmicos de YFV. Mas, como dito antes, pode se iniciar a partir de mosquitos silvestres suscetíveis ao YFV - *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus* – que colonizam as suas florestas, como exemplificado na Figura 37. Com efeito, a cidade do Rio de Janeiro compreende a maior floresta urbana do mundo.

Uma vacina eficaz contra o YFV está disponível desde a década de 1930. Infelizmente, a cobertura incompleta em regiões com risco de infecção é responsável por vários milhares de mortes todos os anos em vários países (Staples e Monath 2008, Vasconcelos e Monath 2016). No Brasil e em particular no seu Sudeste com áreas altamente povoada, como o Rio de Janeiro, uma campanha de vacinação precisa ser implementada, com foco principal nas populações que vivem próximas às florestas para evitar a iminente re-urbanização do YFV.

6. CONCLUSÃO

Todas populações de mosquitos brasileiros e congolezes - *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus* - foram altamente susceptíveis à infecção pelo vírus amarelo, independentemente da origem do vírus, se do genótipo Sul Americano I ou Oeste Africano.

Contudo, as populações das espécies de *Aedes* demonstraram diferenças significativas quanto aos parâmetros determinantes da competência vetorial para o YFV, em particular nas taxas de disseminação e transmissão reveladas por populações de áreas brasileiras livres e endêmicas de febre amarela frente às de área epidêmica/epizoótica.

Considerando-se o conjunto das combinações de cepas virais e populações de mosquito, a disseminação do YFV ocorre do 7º dia após o desafio oral em diante e a transmissão ocorre, em geral, a partir do 14º dia. Pode-se considerar, portanto, que o período de incubação extrínseco do YFV nas espécies e nas condições de incubação testadas é essencialmente de cerca de duas semanas.

Ae. albopictus de área endêmicas, áreas epizoóticas e livre de YFV do Brasil e do Congo foram experimentalmente competentes para transmitir as duas cepas brasileiras e a cepas senegalesa a partir de 14 dpi. Embora a eficiência de transmissão tenha variado de acordo com a combinação YFV e população de mosquitos, algumas populações de *Ae. albopictus* exibiram taxas semelhante ou mais elevadas que as populações de mosquitos reconhecidos como vetores urbanos e silvestres, ou seja *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus*.

O YFV, no seu ciclo silvestre, está às portas das zonas metropolitanas mais densamente povoadas de toda a América do Sul, como a cidade do Rio de Janeiro

onde o *Ae. albopictus* coloniza áreas silvestres e urbana, ambiente onde *Ae. aegypti* abunda. A competência das populações dessas espécies do Rio de Janeiro para transmitir YFV de diferentes linhagens indica elevado risco de ressurgimento da febre amarela urbana no Brasil, seja a partir de vírus introduzido a partir do ciclo silvestre ou por um viajante retornando de regiões da África onde a febre amarela é endêmica.

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alencar J, Gleiser RM, Morone F, Mello CF, Silva J dos S, Serra-Freire NM, Guimarães A.É. A comparative study of the effect of multiple immersions on *Aedini* (Diptera: Culicidae) mosquito eggs with emphasis on sylvan vectors of yellow fever virus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(1):114-7.

Alencar J, Mello CF, Barbosa LS, Gil-Santana HR, Maia D de A, Marcondes CB, *et al.* Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2016; 49(3):351-6.

Alencar J, Morone F, De Mello CF, Dégallier N, Lucio PS, Serra-Freire NM. Flight height preference for oviposition of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of sylvatic yellow fever virus near the hydroelectric reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. J. Med. Entomol. 2013; 50(4):791-795.

Almeida MAB, dos Santos E, Cardoso JC, da Fonseca DF, Noll CA, Silveira VR, Maeda AY, de Souza RP, Kanamura C, Brasil RA. Yellow Fever Outbreak Affecting *Alouatta* Populations in Southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. Am J Primatol 2012; 74:68–76.

Almeida, MA B, Cardoso J da C, Dos Santos, E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJ, Bercini MA, Vettorello KC, Porto MA, Mohrdieck R, Ranieri TM, Schermann MT, Sperb

AF, Paz FZ, Nunes ZM, Romano AP, Costa ZG, Gomes SL, Flannery B 2014. Surveillance for Yellow Fever Virus in Non-Human Primates in Southern Brazil, 2001-2011: A Tool for Prioritizing Human Populations for Vaccination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, Am J Trop Med Hyg. 2014; 90(6):1003-13.

Amraoui F, Vazeille M, Failloux AB. French *Aedes albopictus* are able to transmit yellow fever virus. Euro Surveill. 2016; 21(39).

Añez G, Chancey C, Grinev A, Rios M. 2012. Dengue virus and other arboviruses: a global view of r LUTZ A. Reminiscências da febre-amarela no Estado de São Paulo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 24 (3): 127–42, 1930. isks.ISBT Sci. Ser. 7:274–282.

Araújo F.A.A. Inquérito sorológico em equídeos e aves silvestres para detecção de anticorpos anti-arbovírus de importância em saúde pública no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiás, GO. 2011; 149p.

Arnell H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. Cont. Amer. Entomol. Inst. 1973; 10(2):1-174.

Auguste, A. J. *et al.* Enzootic transmission of yellow fever virus, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2015; 99–102.

Auguste, A. J. *et al.* Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J. Virol.* 2010;. **84**, 9967–77.

Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007; 52:209-29.

Bensabath G, Shope RE, Paes de Andrade AH E, Souza AP. Recuperación de vírus amarílico procedente de un mono centinela, em las cercanias de Belém, Brasil. *Boletín OPAS.* 1966; 60, 187-192.

Beranger, Féraud – *Traité théorique et clinique de la fièvre jaune*. Octave Doin Edit. Paris – 1890.

Black IV WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, Muñoz ML, Farfán-Alé JA, Olson KE, Beaty BJ,. Flavivirus Susceptibility In *Aedes Aegypti*. *Arch. Med. Res.* 2002; 33 (4): 379– 388.

Bolnado, C. M, Gómez M M, dos Santos A A. C., de Abreu F, Ferreira-de-Brito A, de Miranda R M, Castro M G, Lourenço-de-Oliveira R. Genome analysis of yellow fever virus of brazil ongoing outbreak reveals polymorphisms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2017; Vol. 112 (6): 1-5.

Bosio C.F., Beaty B.J., Black W.C., IV Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998;59:965–970.

Bosio, C.F, Fulton, RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WC., 4th Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics. 2000; 156:687–698.

Braks M.A, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. J Med Entomol. 2003;40(6):785-94.

Brès P.L.J. A century of progress in combating yellow fever. Bull. WHO 1986; 64.6: 775-786.

Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. PLoS Pathog. 2007; 3(5): e 75.

Bustamante, Miguel E. – La fiebre amarilla en Mexico y su origen en America. México – 1958.

Camara DC, Codeço CT, Juliano SA, Lounibos LP, Riback TI, Pereira GR, Honorio NA. Seasonal Differences in Density But Similar Competitive Impact of *Aedes albopictus* (Skuse) on *Aedes aegypti* (L.) in Rio de Janeiro, Brazil.

Camara FP, Gomes AL, Carvalho LM, Castello LG. Dynamic behavior of sylvatic yellow fever in Brazil (1954-2008). Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(3):297-9.

Camargo-Neves VL, Poletto DW, Rodas LA, Pachioli ML, Cardoso RP, Scandar SA, Sampaio SM, Koyanagui PH, Botti MV, Mucci LF, Gomes Ade C. Entomological investigation of a sylvatic yellow fever area in São Paulo State, Brazil. Cad Saúde Pública 2005; 21:1278-86.

Cardoso J da 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.

Carvalho RG, Lourenco-de-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(6):787-96.

Causey OR, Kumm HW, Laemmert HW. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil: further studies. *Amer. J. Trop. Med.* 1950; 30:301-312.

Chadee DD, Ganesh R, Hingwan JO, Tikasingh ES. Seasonal abundance, biting cycle and parity of the mosquito *Haemagogus leucocelaenus* in Trinidad, west indies. *Med Vet Entomol* 1995; 9:372-6.

Christophers, S.R. *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever mosquito - its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, London. 1960; 739 pp.

Consoli RAGB OR. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ. 1994: p. 228.

de Filippis AM, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Tavares DS, Jabor AV, Diniz SC, et al. Outbreak of jaundice and hemorrhagic fever in the Southeast of Brazil in 2001: detection and molecular characterization of yellow fever virus. *J Med Virol*. 2002;68(4):620-7.

de Souza RP, Foster PG, Sallum MA, Coimbra TL, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*. 2010;82(1):175-85.

DE Thoisy, B.; Vogel, I; Reynes, J.M.; Pouliquen, J.F.; Carme, B.; Kazanji, M.; Vié, J.C.. Health Evaluation of Translocated Free-Ranging Primates in French Guiana. *Am J Primatol*. 2001; 54, 1-16.

Degallier N, Travassos da Rosa APA, Hervé, JP, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PF, Mangabeira da Silva CJ, Barros VRLS, Dias LB, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG. A comparative study of yellow fever in Africa and South America. *Ciência e Cultura*. 1992;44: 143-6.

Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Hanley KA, Buenemann M, Ba Y, Faye O Weaver SC, Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One*. 2009;4(6): e 5895.

Forattini, O P, *Culicidologia Médica*, vol.2: Identificação, Biologia, Epidemiologia – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002;851pp.

Forattini, O P, *Culicidologia Médica*, vol.2: Identificação, Biologia, Epidemiologia – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002;851pp.

Franco, O. História da febre amarela no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 1969b; 21:315-520.

Franco, O. *História da Febre Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Divisão de Cooperação e Divulgação, Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde. 1969 a.

Franz A.W, Kantor A.M, Passarelli A.L and Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 2015; 7(7), 3741-3767.

Galindo, PA. note on the oviposition behavior of *Sabethes (Sabethoides) chloropterus* Humboldt. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 1957.59:287- 288

Garske T, Van Kerkhove MD, Yactayo S, Ronveaux O, Lewis RF, Staples JE, Perea W, Ferguson NM; Yellow Fever Expert Committee.

Gerber E. Manual for mosquito rearing and experimental techniques *Am. Mosq. Control Assoc.* 1970; 5:109 pp.

Goenaga, S. *et al.* Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12, 986-993.

Guimarães A E, Arlé M, Machado RNM. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. II . Distribuição vertical. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1985; 80(2): 171-185.

Guimarães A E, Arlé M, Machado RNM. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. IV. Preferência alimentar. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1987; 82(2): 277-285.

Haddow AJ, Gillett JD, Highton RB. The mosquitoes of Bwamba County, Uganda; the vertical distribution and biting-cycle of mosquitoes in rain-forest, with further observations on microclimate. Bull Entomol Res. 1947;37(3):301-30.

Haddow, A.J, Williams M.C, Woodall J.P, Simpson, D.I, Goma, L.K. *Twelve isolations of zika virus from Aedes (stegomyia) africanus (theobald)* taken in and above a uganda forest. Bull world health organ. 1964; 31:57-69.

Haddow, AJ, Smithburn KC, et al. Implication of the mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus* Theobald in the forest cycle of yellow fever in Uganda. Ann Trop Med Parasitol. 1948;42(2):218-23.

Harbach R. The Culicidae (Diptera): A Review Of Taxonomy, Classification And Phylogeny. Zootaxa 2007; 1668:591-638.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. Annu. Rev. Entomol.1983; 28:229–262.

Health B Mo. Ministerio da Saúde de divulga novos dados de febre amarela. Available fom: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27482ministerio-da-saude-divulga-novos-dados-de-febre-amarela>. 2017.

Health BM. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no

períodosazonal. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032_FA-ok.pdf. Boletim Epidemiológico. 2015;46(29):1-10.

Hervé, J.P.; Dégallier, N.; Travassos da Rosa, A.P.A. & Sá Filho, G.C. A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana. *Hiléia Médica*, Belém, 1985 7:31-40.

Hervé, J.P.; Dégallier, N.; Travassos da rosa, A.P.A.; Pinheiro, F.P., Sá Filho, G.C. Arboviroses - Aspectos ecológicos. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Fund. Serv. Saúde Pública, Belém, 1986.vol. 1,529 pg

Hovanitz W. Comparisons of mating behavior, growth rate, and factors influencing egg-hatching in South American *Haemogogus* mosquitoes. *Physiol Zool*. 1946;19:35-53. *J Vector Ecol*. 2004b;29(1):94-100.

Juliano, S.A, Ribeiro, G.S, Maciel-de-Freitas R, Castro MG, Codeço C, Lourenço-de-Oliveira R, Lounibos LP. She's a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(8):1070-7.

Karabatsos N. *Internacional catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*. 3rd ed. San Antonio: *Am Soc Trop Med Hyg*; 1985.1147 p.

Kraemer M.U *et al*. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* . *eLife* , Jun 30, 2015.

Kraemer MU, Faria NR, Reiner RC, Jr., Golding N, Nikolay B, Stasse S, *et al*. Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015-16: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2016.

Kumm HW, Cerqueira NL. The role of *Aedes leucocelaenus* in the epidemiology of jungle yellow fever in Brazil. *Bull Ent Res*.1961; 42:195-9.

Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol* 2009; 9:160.

Leach *et al*, Insect transmission of plant disease, New York: MC Graw-Hill. 1940;XVIII + 615-11, 238 fig.

Ling Y, Chen J, Huang Q, Hu Y, Zhu A, Ye S, *et al*. Yellow Fever in a Worker Returning to China from Angola, March 2016. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(7):1317-8.

Lira-Vieira AR, Gurgel-Gonçalves R, Moreira IM, Yoshizawa MA, Coutinho ML, Prado PS *et al*. 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.

Lorenz L, Beaty BJ, Aitken TH, Wallis GP, Tabachnick WJ. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33: 690–694.

Lourenco de Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69(1):105-14.

Lourenço-de-Oliveira R, Castro M.G, Braks M.A, Lounibos L.P. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J Vector Ecol*. 2004 Jun;29(1):94-100.

Lourenço-de-Oliveira R, Castro M.G, Braks M.A, Lounibos L.P. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J Vector Ecol*. 2004 Jun;29(1):94-100.

Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, Bispo de Filippis A.M, Failloux A.B. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(3):437-9.

Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(1):43-54.

Lourenço-de-Oliveira R. Biologia e Comportamento Do Vetor. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (org) DENGUE: TEORIAS E PRÁTICAS. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015a.pp 75-92.

Lourenço-de-Oliveira R¹, Castro M.G, Braks M.A, Lounibos L.P. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J Vector Ecol.* 2004c ;29(1):94-100.

Lourenço-de-Oliveira Rb. Transmissão Vetorial. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (org) DENGUE: TEORIAS E PRÁTICAS. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015. pp 127-141.

Lutz A. Reminiscências da febre-amarela no Estado de São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1930; 24 (3): 127–42.

Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(8):452-8.

Maciel-de-Freitas R, Neto RB, Goncalves JM, Codeco CT, Lourenco-de-Oliveira R. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *J Med Entomol.* 2006;43(6):1112-20.

Mahaffy *et al*, Yellow Fever in western Uganda. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med e Hyg.* 1942; 36:9-20, I MP. (203-206).

Mascheretti M, Tengan CH, Sato HK, Suzuki A, Souza RP, Maeda M, Brasil R, Pereira M, Tubaki RM, Wanderley DM, Fortaleza CM, Ribeiro AF; Grupo de Febre Amarela. 2013. Yellow fever: reemerging in the state of Sao Paulo, Brazil, 2009. *Rev Saude Publica* 47:881-9.

Massad E, Coutinho FA, Burattini MN, Lopez LF. The risk of yellow fever in a dengue-infested area. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(4):370-4. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(3):437-9.

Miller BR, Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(3):476-7.

Miller BR, Monath TP, Tabachnick WJ, Ezike VI. *Trop Med Parasitol.* 1989 Dec;40(4):396-9.

Mir D, Delatorre E, Bonaldo MC, Lourenço-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Report*, (submitted).

Mitchell CJ, Miller BR, Gubler DJ. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *J Am Mosq Control Assoc.* 1987; 3: 460–465.

Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *J Clin Virol.* 2015; 64:160-73. MS –SVS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Guia de Vigilância Epidemiológica, 6. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 309.

Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol.* 2001;75(15):6999-7008.

Nunes MR, Palacios G, Cardoso JF, Martins LC, Sousa EC, Jr., de Lima CP, et al. Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol.* 2012;86(24):13263-71.

PAHO - Pan American Health Organization Outbreak of yellow fever in Paraguay. *Epidemiol Bull.* 2008; 27:2.

Patterns of a sylvatic **yellow** fever virus amplification in southeastern Senegal, Am. J Trop Med Hyg. 2014. Jun 4; 90 (6): 1003-1013.

Patterson KD. Yellow fever epidemics and mortality in the United States, 1693-1905. Soc Sci Med.1992 Apr;34(8):855-65.

Pinheiro FP, Travassos-da-Rosa AP, Moraes MA. An epidemic of yellow fever in Central Brazil, 1972-1973. II. Ecological studies. Am J Trop Med Hyg. 1981;30(1):204-11.

Pinheiro, F.P.*et al.* An epidemic of yellow fever in central Brazil, 1972-1973.II Ecological studies. Amer, J. Trop. Med. Hyg., 30: 204-11. 1981.PLoS One. 2016;11(6):e 0157120 PMID:

Rodhain F, Hannoun C, Jousset FX, Ravisse P. [Isolation of the yellow fever virus in Paris from 2 imported human cases]. Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales. 1979;72(5-6):411-5.

Romano A.P.M., Ramos D.G., Araujo F.A. *et al.* "Febre Amarela no Brasil: recomendações para vigilância, prevenção e controle, 2011. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 20 (1): 101-106.

Romano AP, Costa ZG, Ramos DG, Andrade MA, Jayme Vde S, Almeida MA, et al. Yellow Fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(3): e 2740.

Shannon RC, Whitman L, França M. Yellow fever virus in jungle mosquitoes. Science.1938; vol.88:110-111.

Soper FL. The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. American journal of public health and the nation's health. 1963; 53:7-16.

Souza RP, Petrella S, Coimbra TL, Maeda YA, 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. S. Paulo. 2011; 53(3):133-9.

Sprenger D, Wuithiranyagool T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. J Am Mosq Control Assoc 1986; 2(2): 217-9.

Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. Jama. 2008;300(8):960-2.

Trapido, H & Galindo, P. Mosquitoes associated with sylvan yellow fever near Almirante, Panama. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 6: 114-44, 1957.

Tubaki RM, Menezes RM, Vesgueiro FT, Cardoso RP. Observations on *Haemagogus janthinomys* Dyar (Diptera: Culicidae) and other mosquito populations within tree holes in a gallery forest in the northwestern region of Sao Paulo state, Brazil. Neotropical Entomol. 2010;39(4):664-70.

Van der Stuyft P, Gianella A, Pirard M, Cespedes J, Lora J, Peredo C, Pelegrino JL, Vorndam V, Boelaert M. Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. Lancet. 1999;353(9164):1558-62.

Vasconcelos PF, Bryant JE, da Rosa TP, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett AD. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. Emerg Infect Dis. 2004;10(9):1578-84.

Vasconcelos PF, Monath TP. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. Vector Borne Zoonotic Dis. 2016. 16 (8) 566-7

Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(2):275-93.

Vasconcelos PF. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. Rev Saude Publica. 2010;44(6):1144-9.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG et al. 2001. Yellow fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998-1999. Entomologic and epidemiologic findings. *Emerging Infectious Disease* 7:565-569.

Vasconcelos, P. F. C. *et al.* Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis*) **10**, 2004; 1578–1584.

Vazeille M, Yebakima A, Lourenco-de-Oliveira R, Andriamahefazafy B, Correira A, Rodrigues JM, et al. Oral receptivity of *Aedes aegypti* from Cape Verde for yellow fever, dengue, and chikungunya viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(1):37-40.

Walter Reed Biosystematics Unit. Systematic catalog of Culicidae. [cited 2016, Dec 18]. [http://www.mosquitocatalog.org/Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector](http://www.mosquitocatalog.org/Epidemic%20yellow%20fever%20caused%20by%20an%20incompetent%20mosquito%20vector).

Whitman L, Antunes PCA 1938. The transmission of two strains of jungle yellow fever virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med* 18: 135-147.

WHO - World Health Organization. International Travel and Health: Situation as on 1 January 2010. Geneva: WHO; 2010.

WHO --World Health Organization (WHO). 1989. *Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors*. Unpublished document WHO/VBC/89.967. Geneva: World Health Organization.

WHO- World Health Organization (WHO) 2015.

Woodall JP, Yuill TM. Why is the yellow fever outbreak in Angola a 'threat to the entire world'? *Int J Infect Dis.* 2016; 48:96-7.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog* 2008;4(7):e1000098. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* 2014;11(5):e1001638. Completar

Zavortink, T.J, Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXVIII. The New World species formerly placed in *Aedes* (*Finlaya*). *Contrib. Amer. Entomol. Inst.*, 1972. 8 (3): 1-206

Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge JM, Lourenco-De-Oliveira R, Caro V, Lambrechts L, Failloux AB. three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying Chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci.* 2014;281.

8. ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Países e áreas sob risco de ocorrência de febre amarela no mundo.	1
Figura 2	Número anual de casos de febre amarela no mundo e a cobertura vacinal, entre 1980 e 2015.	3
Figura 3	Capa do jornal Herper's Weekly, do dia 22 de julho de 1909, contendo ilustração feita por Wiilliam A Rogers representando caricaturalmente o obstáculo que a febre amarela representou para o avanço da abertura do Canal do Panamá, no início do século XX.	7
Figura 4	Distribuição das epidemias de febre amarela na África, entre 1980 e 2010.	9
Figura 5	Número de óbitos por febre amarela na zona urbana do Rio de Janeiro, de 1850 a 1902.	12
Figura 6	Casos de Febre amarela silvestre, confirmados laboratorialmente, de 1932 a 1967 no Brasil	16
Figura 7	Representação esquemáticas de possíveis ciclos de transmissão vetorial de arbovírus.	19
Figura 8	Filogenia do vírus da febre amarela, mostrando os cinco genótipos reconhecidos no continente africano.	20
Figura 9	Filogenia do vírus da febre amarela, com ênfase no relacionamento entre os genótipos sul-americanos e os Africanos.	22
Figura 10	Filogenia do vírus da febre amarela baseada em análise de sequências de 576 nucleotídeos da região NS5/3'NCR do genoma viral.	23
Figura 11	Representação esquemática de três possíveis ciclos de transmissão vetorial do vírus da febre amarela.	25
Figura 12	Evolução geográfica do risco de transmissão de febre amarela no Brasil, de 2001 a 2010.	28
Figura 13	Série histórica do número de casos humanos confirmados de febre amarela silvestre e a letalidade no Brasil, 1980 a 2016.	30

Figura 14	Distribuição dos municípios segundo a recomendação de vacinação para controle de surto e prevenção da Febre Amarela, Brasil, 2017.	31
Figura 15	Fotografia das fêmeas <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .	37
Figura 16	Distribuição geográfica provável de <i>Aedes aegypti</i> no mundo	38
Figura 17	Distribuição geográfica provável de <i>Aedes albopictus</i> no mundo.	39
Figura 18	Filogenia de Culicidae, proposta por Harbarch (2007).	40
Figura 19	Fotografia de fêmea de <i>Haemagogus leucocelaenus</i> .	43
Figura 20	Distribuição geográfica de espécies de <i>Haemagogus</i> e de <i>Sabethes chloropterus</i> nas Américas.	43
Figura 21	Fotografia de <i>Sabethes albiprivus</i> mentidos em colônia em laboratório.	46
Figura 22	Esquema mostrando momento e barreiras da infecção de um mosquito vetor por arbovírus.	48
Figura 23	Distribuição geográfica aproximada de linhagens (1D e 1E) do genótipo do vírus da febre amarela do genótipo Sul-americano I.	51
Figura 24	Desenho esquemático de uma ovitrampa (a), Criação dos mosquitos (b), Espécies desafiadas com as três cepas do vírus da febre amarela (C).	56
Figura 25	Desenho esquemático da alimentação infectante das fêmeas de mosquitos.	60
Figura 26	Desenho esquemático do processamento das fêmeas ingurgitadas e inoculação dos triturados (Cabeça e corpo) e salivas nos cultivos.	61
Figura 27	RT-PCR de amostras de machos de <i>Hg. leucocelaenus</i> , examinados para detecção de infecção por transmissão transovariana.	62

Figura 28	Imunofluorescência Indireta de cultura de células C6/36 inoculadas com amostras de homogenatos de corpo (1) e cabeça (2) e de saliva (3), após 5 dias de incubação; focos demonstrando de replicação viral.	63
Figura 29	Competência vetorial para o vírus da febre amarela em <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> de diferentes cenários epidemiológicos no Brasil.	64
Figura 30	Competência vetorial para três cepas do vírus da febre amarela em três populações de <i>Aedes aegypti</i> provenientes de diferentes cenários epidemiológicos no Brasil.	66
Figura 31	Competência vetorial para três cepas do vírus da febre amarela em três populações de <i>Aedes albopictus</i> provenientes de diferentes cenários epidemiológicos no Brasil.	71
Figura 32	Competência vetorial para três cepas do vírus da febre amarela em mosquitos urbanos – <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> – de Brazzaville, Congo.	75
Figura 33	Competência vetorial para o vírus da febre amarela em mosquitos silvestres brasileiros - <i>Haemagogus leucocelaenus</i> e <i>Sabethes albiprivus</i> .	77
Figura 34	Comparação eficiência para a transmissão para o vírus da febre amarela em mosquitos brasileiros silvestres - <i>Haemagogus leucocelaenus</i> e <i>Sabethes albiprivus</i> – e urbanos – <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .	78
Figura 35	Distribuição geográfica dos casos humanos suspeitos de febre amarela notificados ao Ministério da Saúde, entre 1 de dezembro de 2016 a 10 de maio de 2017.	83
Figura 36	Distribuição das epizootias, confirmadas laboratorialmente e suspeitas de febre amarela no Brasil, de 1 de dezembro de 2016 a 10 de maio de 2017.	83
Figura 37	Distribuição temporal dos casos humanos de febre amarela notificados ao Ministério da Saúde pelos estados do Sudeste, de dezembro de 2016 a 10 de maio de 2017.	85
Figura 38	Progressão espacial das epizootias pelo vírus da febre amarela nos municípios do Estado do Rio de Janeiro, assinalando aqueles com epizootias em investigação (verde) e confirmadas, em março (acima) e o acumulado até final de abril (abaixo).	86
Figura 39	Representação esquemática de potenciais intercessões da distribuição espacial de mosquitos nos ambientes modificado e florestal e interações ecológicas, ilustrando possibilidades	90

de infecção em humanos e subsequente re-emergência da febre amarela urbana a partir de epizootias. Os pontos coloridos representam diferentes mosquitos: verde, *Hg. leucocelaenus* e *Sa.albiprivus*, vermelho, *Ae. albopictus*, e amarelo, *Ae. aegypti*.

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Populações de mosquitos desafiadas as cepas do vírus da febre amarela.	57
Tabela 2	Comparações de taxas de infecção para três cepas de vírus da febre amarela em mosquitos urbanos e suburbanos - <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> – do Brasil e Congo.	67
Tabela 3	Comparações de taxas de disseminação para as três cepas de vírus da febre amarela em mosquitos urbanos e suburbanos - <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> – do Brasil e Congo.	69
Tabela 4	Comparações de taxas de transmissão para as três cepas de vírus da febre amarela em mosquitos urbanos e suburbanos - <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> – de Brazaville, Congo.	73

LISTA DE ABREVIACOES

ATP	Adenosina Tri-fosfato
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetil Celulose
DENV	Vírus Dengue
DPI	Dia pós infecção
FA	Febre Amarela
FFU	Unidade Formadora de Focus
IgG	Imunoglobulina G
L15	Leibovitz 15
MEB	Barreira de escape do intestino
MIB	Barreira do intestino médio
C	Celsius
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNH	Primata não humano
RH	Umidade Relativa
RPM	Rotação Por Minuto
RT	Transcriptase Reversa
SEGEB	Barreira de Escape da Glndula Salivar
SFB	Soro Fetal Bovino
SGIB	Barreira de Infecção da Glndula Salivar
TDI	Taxa de Disseminação
TI	Taxa de Infecção
TT	Taxa de Transmissão
ul	Microlitro
WHO	World Health Organization
YFV	Vírus Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika