

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

Ana Gabriella Stoffella Dutra

**PERFIL SOROLÓGICO CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA (YFV) EM UMA
POPULAÇÃO DE ÁREA DE RISCO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Belo Horizonte
2019

Ana Gabriella Stoffella Dutra

**PERFIL SOROLÓGICO CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA (YFV) EM UMA
POPULAÇÃO DE ÁREA DE RISCO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza
Trindade

Belo Horizonte

2019

043

Dutra, Ana Gabriella Stoffella.

Perfil sorológico contra o vírus da febre amarela (YFV) em uma população de área de risco do estado de Minas Gerais [manuscrito] / Ana Gabriella Stoffella Dutra. – 2009. 131 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Giliane de Souza Trindade.

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

1. Microbiologia. 2. Febre Amarela. 3. Neutralização. 4. Epidemiologia. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANA GABRIELLA STOFFELLA DUTRA
Nº REGISTRO: 2017674316

Às 14hs horas do dia 22 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Betânia Paiva Drumond (titular interno), Andréa Teixeira de Carvalho (titular externo) e o(a) Prof(a). Giliane de Souza Trindade - Orientador(a), para julgar o trabalho final "Perfil Sorológico contra o vírus da Febre Amarela (YFV) em uma população de área de risco do estado de Minas Gerais", do(a) aluno(a) Ana Gabriella Stoffella Dutra, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

Dr(a). Betânia Paiva Drumond Betânia Paiva Drumond
Dr(a). Andréa Teixeira de Carvalho Andréa Teixeira de Carvalho
Prof(a). Giliane de Souza Trindade [Orientador(a)] Giliane de Souza Trindade


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente no meu caminho e por ter me proporcionado saúde e força para concluir mais esta etapa.

À minha querida orientadora Giliane, por todos os ensinamentos, atenção, paciência e confiança.

A cada um dos meus professores (as) do mestrado, da especialização e da PUC por todo aprendizado e dedicação. Aos professores do Laboratório de Vírus, Giliane, Erna, Betânia, Jônatas e Cláudio, obrigada por serem professores incríveis, grandes exemplos para nós e por sempre nos incentivarem nesse caminho.

Aos queridos colegas do LabVírus, pela receptividade e convívio. Obrigada família Labviridae! Em especial aos meus amigos Ana Lu, Nati Ingrid, Jaque, Nídia, Carol, Natalinha, Erik, pela amizade e por tornarem meus dias mais alegres. Vocês foram muito importantes nessa caminhada.

A Ana e Mirela, por toda ajuda e disponibilidade. Obrigada meninas!

Aos integrantes do grupo de pesquisa ECOVIR, obrigada por tudo que me ensinaram e pelo companheirismo. Em especial ao Galileu, por ter se tornado meu amigo mesmo antes de nos vermos pessoalmente e por toda dedicação em me ajudar sempre que preciso. E a minha amiga Jaque, por me acolher nos primeiros dias de Lab, por compartilhar os conhecimentos, por todas as PRNTs que fizemos (rs), pela parceria, pelos trabalhos de campo no Serro e por todas as risadas.

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

À minha família e amigos por todo amor e compreensão.

Aos membros da banca pela disponibilidade e por toda contribuição.

À UFMG e as agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Muito obrigada!

“Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos”.

L. M. Leonov

RESUMO

A família *Flaviviridae* compreende vírus de genoma RNA, e muitos flavivírus são considerados patógenos de importância médica e veterinária. O gênero *Flavivirus* é o maior da família, e neste está incluído o *Yellow fever virus* (YFV). O YFV é transmitido por mosquitos dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes* para os seres humanos e primatas não humanos. A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa febril aguda que pode apresentar quadros graves e fatais. A FA é endêmica na África e América do Sul e ocasiona epidemias recorrentes nessas regiões. A principal forma de prevenção é através da vacinação. Este estudo avaliou o perfil sorológico contra o YFV em uma população rural e urbana de uma área de risco para FA e em pacientes com suspeita clínica de arbovirose provenientes de Diamantina. Foi escolhido o município do Serro devido ao histórico de casos de casos de FA, ao fato de se localizar na área atual com recomendação permanente de vacinação contra FA e devido a estudos pregressos do grupo de ecologia de viroses emergentes no município. Para alcançar esse objetivo, as 632 amostras de soro humano deste estudo foram submetidas a técnica de soroneutralização por redução de placa (PRNT) a qual é padrão ouro para o diagnóstico de infecções por flavivírus. As populações rural e urbana do Serro foram avaliadas separadamente e foram considerados dois cut-offs para a técnica. Foi observada uma soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV de 75,2% na PRNT₅₀ e de 34,8% na PRNT₉₀ para a população rural do Serro e de 73,5% na PRNT₅₀ e 30,5% na PRNT₉₀ para a população urbana do município. Para os pacientes de Diamantina a soroprevalência foi de 72,5% na PRNT₅₀ e de 35,3% na PRNT₉₀. Devido a reatividade cruzada dos flavivírus as amostras foram testadas também para a presença de anticorpos para Dengue. Como resultado, 6,3% foram positivas para IgG e 2,5% para IgM por meio de teste rápido imunocromatográfico e 10,7% das amostras foram positivas para DENV-1 por meio de ELISA IgG. Este estudo reforça a importância das pesquisas que buscam elucidar a soroprevalência de anticorpos neutralizantes para FA em populações de risco. Além de contribuir para rastrear indivíduos susceptíveis e alertar para ações de vigilância e prevenção nestas áreas.

Palavras-chave: Febre Amarela; *Yellow fever virus*; Serro; Diamantina; Soroneutralização; Epidemiologia.

ABSTRACT

The family *Flaviviridae* comprises RNA viruses, with many representatives considered pathogens of medical and veterinary importance. The genus *Flavivirus* is the largest in the family and includes *Yellow fever virus* (YFV). YFV is transmitted to humans and non-human primates by mosquitoes of the genera *Haemagogus*, *Sabethes* and *Aedes*. The Yellow Fever (YF) is an acute febrile illness that can cause severe and fatal conditions. YF is endemic in Africa and South America, and causes recurrent epidemics in these regions. The main preventive measure is through vaccination. This study aimed to evaluate the serological profile against YFV in a rural and urban population of an area at risk for YF and in patients with clinical suspicion of arboviruses coming from the city of Diamantina. The city of Serro was chosen because of the history of cases of YF, as well as the fact that it is located in the current area with permanent recommendation of vaccination against YF and due to previous studies of the group of ecology of emerging viruses in the area. In order to achieve this goal, 632 human serum samples from this study were submitted to plaque reduction serum neutralization (PRNT) assay, which is gold standard for the diagnosis of flavivirus infections. The rural and urban populations of the Serro were evaluated separately and were considered two cut-offs for the technique. A seroprevalence of neutralizing anti-YFV antibodies of 75,2% in the PRNT₅₀ and 34,8% in the PRNT₉₀ was detected in the rural population, whereas 73,5% in the PRNT₅₀ and 30,6% in the PRNT₉₀ was detected in the urban population. For patients from Diamantina, seroprevalence was 72,5% in PRNT₅₀ and 35,3% in PRNT₉₀. Due to the cross reactivity into the genus *Flavivirus* the serum samples were also tested for the presence of Dengue antibodies. A total of 6,3% of samples tested positive for IgG antibodies and 2,5% tested positive for IgM antibodies by rapid immunochromatographic test and 10,7% were positive for DENV-1 by IgG ELISA. This study reinforces the importance of research that look for elucidate the seroprevalence of neutralizing antibodies to YF in populations at risk. In addition to helping to track susceptible individuals and alert to surveillance and prevention actions in these areas.

Key words: Yellow fever; *Yellow fever virus*; Serro; Diamantina; Seroneutralization; Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore Filogenética da família <i>Flaviviridae</i>	15
Figura 2 – Partícula viral de YFV.....	17
Figura 3 – Esquema do RNA viral do YFV.....	18
Figura 4 – Proteínas virais e suas respectivas funções.....	19
Figura 5 – Ciclo de multiplicação do YFV.....	21
Figura 6 – Árvore filogenética demonstrando os sete genótipos do YFV.....	23
Figura 7 – Ciclos de transmissão da Febre Amarela na América do Sul e África.....	27
Figura 8 – Iceberg das infecções por Febre Amarela.....	29
Figura 9 – Diagrama das fases da infecção por Febre Amarela.....	30
Figura 10 – Mapas da América do Sul e África demonstrando os países onde o YFV está presente e os locais com recomendação de vacinação.....	31
Figura 11 – Série histórica da Febre Amarela no Brasil.....	36
Figura 12 – Disseminação do YFV pelos biomas brasileiros.....	37
Figura 13 – Mapas de Minas Gerais com a distribuição de casos humanos e epizootias confirmadas nos períodos de 2016/2017 e 2017/2018.....	38
Figura 14 – Casos de FA reportados a OMS anualmente e cobertura vacinal contra febre amarela no período de 1980 a 2017.....	44
Figura 15 – Áreas com recomendação de vacinação contra Febre Amarela, 2016-2019.....	45
Figura 16 – Perfil de resposta imunológica após a vacinação contra Febre Amarela.....	48
Figura 17 – Padrão de resposta imune pós vacinação contra FA.....	49
Figura 18 – Indicações de diagnóstico para FA de acordo com o dia de início de sintomas.....	50
Figura 19 – Fluxograma com os principais testes laboratoriais específicos para Febre Amarela.....	51
Figura 20 – Mapas evidenciando a localização geográfica das áreas de estudo no estado de Minas Gerais.....	59
Figura 21 – Distribuição de casos de Febre Amarela por ano no Brasil.....	67

Figura 22 – Distribuição de casos de Febre Amarela por estados no Brasil.....	68
Figura 23 – Distribuição de casos de Febre Amarela por sexo no período de 2001 a 2016.....	68
Figura 24 – Desfecho clínico dos casos confirmados de Febre Amarela no período de 2001 a 2016.....	69
Figura 25 – Número de casos de Febre Amarela por faixa etária no período de 2001 a 2016.....	69
Figura 26 – Número de casos confirmados de Febre Amarela em Minas Gerais.....	70
Figura 27 – Mapa do estado de Minas Gerais com municípios com casos de Febre Amarela registrados	71
Figura 28 – Resultados referentes aos ensaios de PRNT ₅₀ e PRNT ₉₀ para as amostras da população rural do município do Serro.....	78
Figura 29 – Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população rural do Serro.....	79
Figura 30 – Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população urbana do Serro, 2015.....	81
Figura 31 – Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população urbana do Serro, 2017.....	81
Figura 32 – Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população urbana do Serro, 2018.....	82
Figura 33 – Resultados referentes aos ensaios de PRNT ₅₀ e PRNT ₉₀ para as amostras da população urbana do município do Serro.....	83
Figura 34 – Resultados referentes aos ensaios de PRNT ₅₀ e PRNT ₉₀ para as amostras dos pacientes da SRS de Diamantina.....	88
Figura 35 – Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados dos pacientes da SRS de Diamantina em relação ao controle de vírus.....	88
Figura 36 – Diagramas de Venn demonstrando os dados dos três testes sorológicos realizados.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização demográfica da população rural do município do Serro. Coletas realizadas nos anos de 2012 e 2013.....	72
Tabela 2 – Caracterização demográfica da população urbana do município do Serro, referente aos anos de 2015, 2017 e 2018.....	73
Tabela 3 – Fatores de exposição para Febre Amarela.....	75
Tabela 4 – Fator de exposição para Febre Amarela.....	77
Tabela 5 – Variáveis Demográficas dos pacientes da SRS de Diamantina.....	77
Tabela 6 – Variáveis demográficas e fatores de exposição associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV.....	80
Tabela 7 – Comparação da soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV para os três anos de coleta na área urbana.....	82
Tabela 8 – Variáveis demográficas e fatores de exposição associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Dados dos anos de 2015, 2017 e 2018.....	84
Tabela 9 – Fatores de exposição para FA associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Dados referentes à população urbana dos anos de 2017 e 2018.....	85
Tabela 10 – Comparação da soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV nas populações rural e urbana do Serro.....	86
Tabela 11 – Participantes que comprovaram histórico de vacinação contra FA e não apresentaram anticorpos neutralizantes anti-YFV detectáveis.....	87
Tabela 12 – Variáveis demográficas associadas à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV.....	89
Tabela 13 – Comparação da soroprevalência de anticorpos anti-DENV nas populações rural e urbana do Serro.....	91
Tabela 14 – Comparação da soroprevalência de anticorpos IgG anti-DENV1 nas populações rural e urbana do Serro.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL – Microlitro

ACRV- Área com recomendação de vacina

ASRV - Área sem recomendação de vacina

ATCC – *American Type Culture Collection*

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CMC – Carboximetilcelulose

CO₂ – Dióxido de carbono

COEP – Comitê de Ética e Pesquisa

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DENV - *Dengue virus*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECOVIR – Ecologia de Vírus Emergentes

ELISA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno sorbent Assay*)

FA – Febre Amarela

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

HIV – *Human immunodeficiency virus*

IBF – Instituto Brasileiro de Florestas

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IEF – Instituto Estadual de Florestas

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INF – Interferon

IOM – Instituto Octávio Magalhães

JEV - *Japanese encephalitis virus*

kb – Quilobase

MEM – Meio mínimo essencial

mL – Mililitro

mRNA – RNA mensageiro

NCR - Regiões não codificantes

nm – Nanômetro

NS – Proteínas não estruturais

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

PBS – Tampão salina fosfato

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

pH - Potencial hidrogeniônico

PNH - Primatas não humanos

prM - Precursor M

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

RdRp - RNA polimerase RNA- dependente

RNA – Ácido ribonucleico

RT- PCR - Reação em cadeia da polimerase de Transcrição Reversa

SFB – Soro fetal bovino

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SLEV – *Saint Louis encephalitis virus*

SNC – Sistema Nervoso Central

SRS – Superintendência Regional de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGN – Rede trans-Golgi

TLR – Receptor do tipo toll (*toll like receptor*)

TNF – Fator de necrose tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UN – Unidades neutralizantes

TLR – Receptores tipo Toll

WNV – *West Nile virus*

YEL-AND - Doença neurotrópica associada à vacina

YEL-AVD - Doença viscerotrópica associada à vacina

YFV - *Yellow fever virus*

ZIKV- *Zika virus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Flavivírus	15
1.1.1 Taxonomia.....	15
1.2 Partícula viral.....	16
1.2.1 Morfologia.....	16
1.2.2 Genoma.....	18
1.3 Ciclo de multiplicação viral	19
1.4 Variabilidade Genética	21
1.5 Febre Amarela.....	24
1.5.1 Histórico	24
1.5.2 Transmissão.....	26
1.5.3 Patogênese e aspectos clínicos	28
1.5.4 Epidemiologia.....	30
1.5.5 Reemergência de 2016-2018 no Brasil.....	35
1.5.6 Vacinação e prevenção	40
1.5.7 Febre Amarela: imunidade humoral e celular	46
1.5.8 Diagnóstico e tratamento.....	50
2. JUSTIFICATIVA	54
3. OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	57
5. METODOLOGIA	58
5.1 Análises epidemiológicas com base em dados do SINAN	58
5.2 Áreas de estudo	59
5.3 Amostras	59
5.4 Cálculo amostral.....	60
5.5 Seleção dos Participantes	61
5.6 Considerações Éticas.....	61
5.7 Instrumentos para Coleta de Informações.....	62
5.8 Análises estatísticas	62
5.9 Metodologia Laboratorial	62

5.9.1 Células	62
5.9.2 Vírus	63
5.9.3 Produção de Vírus.....	63
5.9.4 Titulação.....	64
5.9.5 Ensaio de Soroneutralização.....	64
5.9.6 Teste imunocromatográfico	65
5.9.7 Ensaio Imunoenzimático	66
6. RESULTADOS.....	67
6.1 Análises epidemiológicas do SINAN	67
6.2 Caracterização das populações analisadas	71
6.2.1 População rural do município do Serro.....	71
6.2.2 População urbana do município do Serro.....	73
6.2.3 Fatores de exposição relacionados à Febre Amarela.....	74
6.2.4 Pacientes da SRS de Diamantina.....	77
6.3 Avaliação Sorológica para Febre Amarela.....	78
6.3.1 População rural do município do Serro.....	78
6.3.2 População urbana do município do Serro.....	80
6.3.3 Soroprevalência de anticorpos anti-YFV nas populações rural e urbana do Serro.....	86
6.3.4 Indivíduos com histórico de vacinação soronegativos.....	87
6.3.5 Pacientes da SRS de Diamantina.....	87
6.4 Avaliação da reatividade cruzada com outros flavivírus.....	89
6.4.1 População rural do município do Serro.....	90
6.4.2 População urbana.....	90
6.4.3 Pacientes da SRS de Diamantina.....	90
6.4.4 Comparação da presença de anticorpos anti-DENV.....	91
7. DISCUSSÃO.....	93
8. CONCLUSÕES.....	104
9. PERSPECTIVAS.....	105
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Flavivírus

1.1.1 Taxonomia

A família *Flaviviridae* inclui vírus envelopados com genoma RNA de fita positiva, sendo que grande parte dos vírus compreendidos nessa família são patógenos de importância médica e veterinária. O termo *Flaviviridae* deriva do latim “flavus” que significa amarelo, e refere-se ao vírus da Febre Amarela considerado protótipo da família (LINDENBACH *et al.*, 2013; ICTV, 2016; SIMMONDS *et al.*, 2017). Atualmente essa família é dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus* (Figura 1). Esses vírus, pertencentes aos diferentes gêneros, apresentam características similares como morfologia da partícula, estrutura de genomas e estratégias de replicação. Porém, também demonstram divergências quanto a características biológicas e ausência de reatividade cruzada sorológica (LINDENBACH *et al.*, 2013; ICTV, 2016; SIMMONDS *et al.*, 2017).

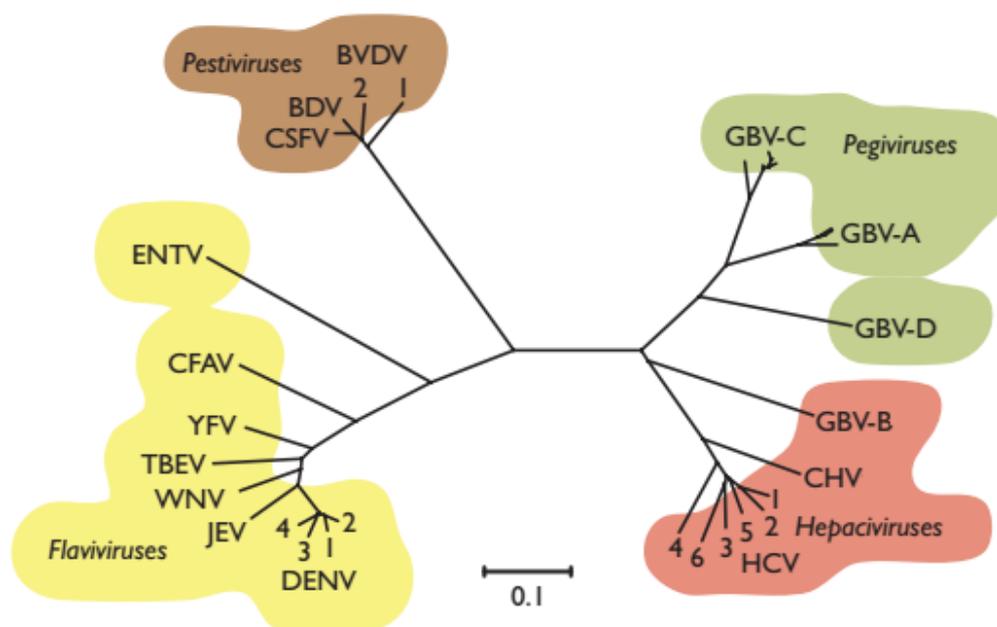


Figura 1: Árvore filogenética da família *Flaviviridae*. Árvore construída em análise de neighbor-joining a partir da RNA polimerase dependente de RNA (RdRPs), são demonstrados os quatro gêneros e as espécies incluídas na família *Flaviviridae*. Fonte: LINDENBACH *et al.*, 2013.

O gênero *Flavivirus* é o maior dentre eles, compreendendo 53 espécies virais, dentre elas destacam-se *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), Zika vírus (ZIKV) e *Saint. Louis*

encephalitis virus (SLEV) (LINDENBACH *et al.*, 2013; ICTV, 2016). A maioria dos flavivírus são transmitidos aos hospedeiros vertebrados através de vetores artrópodes, e essa característica faz com que esses vírus sejam denominados arbovírus, do inglês *arthropod borne viruses*. Sendo assim, os flavivírus podem ser classificados em três categorias de acordo com seu modo de transmissão: vírus transmitidos por mosquitos, vírus transmitidos por carrapatos e vírus sem vetor artrópode conhecido (GOULD; SOLOMON, 2008; JULANDER, 2013; LINDENBACH *et al.*, 2013).

As espécies incluídas no gênero *Flavivirus* são determinadas de acordo com dados de filogenética, antigenicidade, patogenicidade, vetores, associações ecológicas e distribuição geográfica. Os representantes do gênero possuem uma ampla dispersão geográfica e muitos vírus são relacionados a doenças emergentes e reemergentes em humanos, principalmente aqueles transmitidos por mosquitos, como DENV, YFV, ZIKV e WNV (GAUNT *et al.*, 2001; SOLOMON; MALLEWA, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008; LINDENBACH *et al.*, 2013; FARIA *et al.*, 2016).

1.2 Partícula viral

1.2.1 Morfologia

Os flavivírus são vírus esféricos que apresentam genoma de RNA de fita-simples, sentido positivo. O vírus da Febre Amarela é um vírus envelopado, de capsídeo icosaédrico com diâmetro de aproximadamente 50 nm, é um vírus relativamente pequeno quando comparado a outros já identificados na virosfera (Figura 2) (BARRETT, 2001; LINDENBACH *et al.*, 2013). O envelope viral proveniente das células hospedeiras é composto por uma bicamada lipídica, e representa de 15-20% do peso total da partícula viral (BARRETT, 2001; GARDNER; RYMAN, 2010; LINDENBACH *et al.*, 2013).

A partícula de YFV possui três proteínas estruturais, a proteína (C) do capsídeo que envolve o genoma, as proteínas do envelope (E) e de membrana (M). A glicoproteína E é o principal componente da superfície viral e determinante antigênico do vírion. Essa glicoproteína desempenha papel primordial na infecção viral, particularmente nas etapas de ligação e fusão do vírus à célula hospedeira, além de ser alvo da resposta imune do hospedeiro (BARRETT, 2001; MONATH, 2001; LINDENBACH *et al.*, 2013).

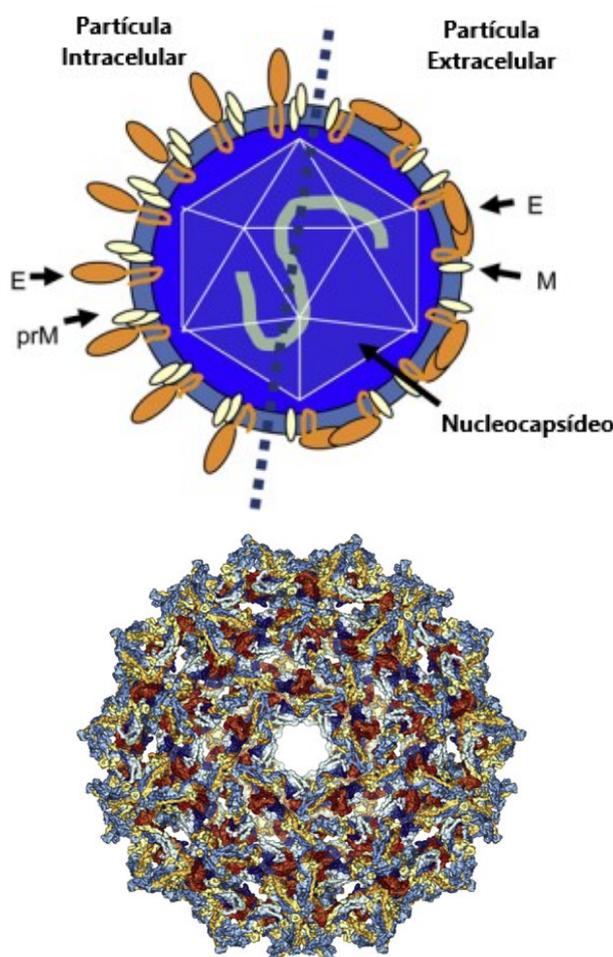


Figura 2: Partícula viral de YFV. Estrutura e morfologia da partícula viral do YFV, e representação de Criomicroscopia eletrônica (Crio-EM) de uma partícula imatura (intracelular). Fonte: Adaptado de GARDNER; RYMAN, 2010; DOUAM; PLOSS, 2018.

Podem ser distinguidas dois tipos de partículas, as imaturas intracelulares que possuem o precursor M (prM) e as partículas maduras extracelulares que apresentam a proteína M. A conversão de partículas imaturas em maduras é verificada quando as partículas imaturas são direcionadas para o ambiente de baixo pH da rede trans-Golgi e ocorre um rearranjo das glicoproteínas, onde o precursor prM é clivado proteoliticamente durante a maturação do vírion produzindo a proteína M. Essa clivagem também ocasiona o rearranjo da proteína E em dímeros, uma conformação presente nos vírions maduros e é realizada por proteases celulares tipo furina (BARRETT, 2001; YU *et al.*, 2008; LINDENBACH *et al.*, 2013).

As partículas virais permanecem estáveis em pH alcalino (8-9), porém são inativadas quando em condições de pH ácido, em temperatura de 39°C ou mais, quando expostas à ação de detergentes, clorofórmio, éter e solventes orgânicos, e

quando são expostas à luz ultravioleta (BARRETT, 2001; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

1.2.2 Genoma

O genoma do YFV consiste em uma única molécula de RNA de fita-simples de sentido positivo, infecciosa, com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (11kb). Esse genoma apresenta na extremidade 5' uma estrutura de cap tipo 1 (m-7GpppAmp) e na extremidade 3' não está presente a cauda poli (A) como nos mRNAs do hospedeiro (MARFIN; MONATH, 2008; LINDENBACH *et al.*, 2013; BEASLEY *et al.*, 2015).

Assim como os outros flavivírus, o genoma do YFV possui apenas uma fase aberta de leitura (ORF – Open Reading Frame) de 10,236–10,239 nucleotídeos. Nas extremidades dessa única e longa ORF são encontradas regiões não codificadoras (NCR), sendo a região 5' composta por aproximadamente 100 nucleotídeos e a 3' de 400 a 700 nucleotídeos. As regiões não codificadoras são importantes, pois influenciam na replicação e tradução do genoma viral, e a ocorrência de mutações ou deleções nessas regiões pode afetar a replicação viral e a virulência (Figura 3) (MARFIN; MONATH, 2008; LINDENBACH *et al.*, 2013; BEASLEY *et al.*, 2015; SIMMONDS *et al.*, 2017).

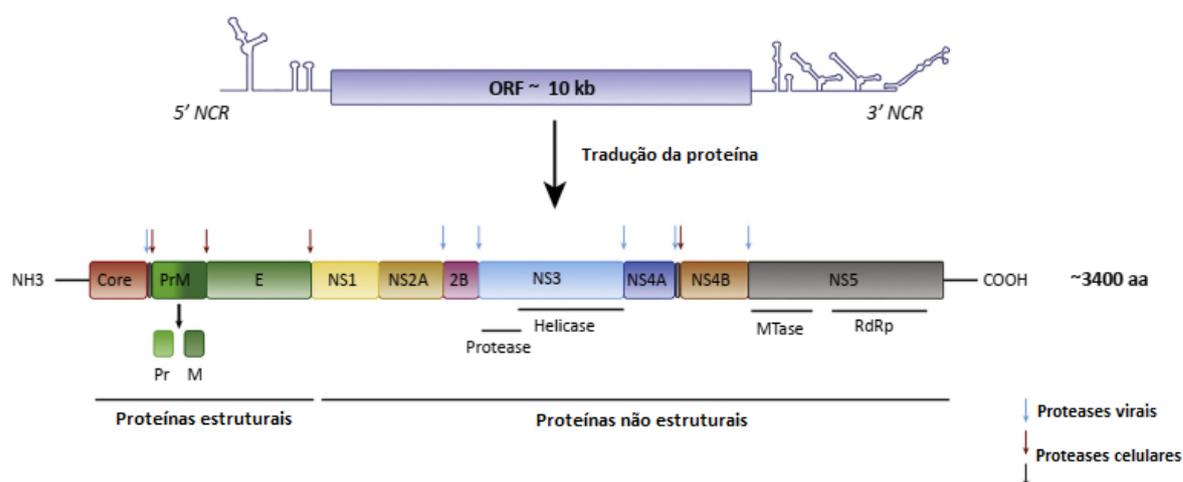


Figura 3: Esquema do RNA viral do YFV. Genoma de RNA fita-simples (+) de aproximadamente 11kb. Destaque para a presença de uma única ORF e para a poliproteína que posteriormente será clivada em proteínas virais estruturais e não-estruturais do YFV. Fonte: DOUAM; PLOSS, 2018.

A tradução do RNA de YFV a partir dessa única janela de leitura codifica apenas uma poliproteína, que posteriormente será clivada por proteases virais e celulares para a formação das proteínas virais maduras. As proteínas virais sintetizadas são classificadas em estruturais e não-estruturais. As três proteínas estruturais (C – prM- E) são codificadas próximas a extremidade 5' e são seguidas por sete proteínas não-estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 4) (MARFIN; MONATH, 2008; FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009; LINDENBACH *et al.*, 2013; FERNÁNDEZ-SANLÉS *et al.*, 2017; SIMMONDS *et al.*, 2017).

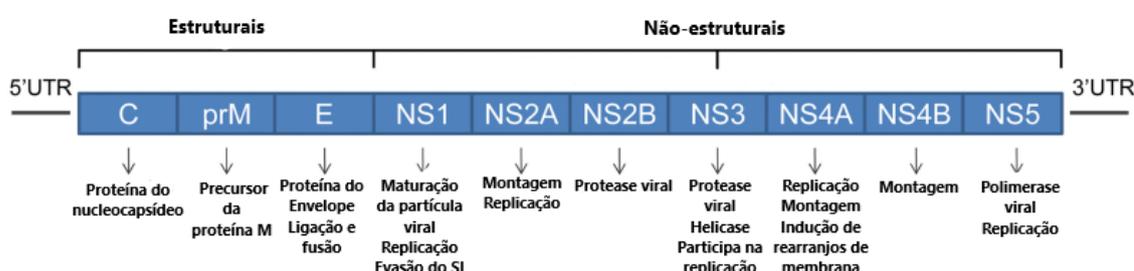


Figura 4: Proteínas virais e suas respectivas funções. São destacadas as três proteínas estruturais e as sete proteínas não-estruturais do vírus, e suas posições no genoma viral. Fonte: Adaptado de FERNÁNDEZ-SANLÉS *et al.*, 2017.

1.3 Ciclo de multiplicação viral

O ciclo de replicação do YFV inicia-se com a adsorção, etapa em que ocorre a ligação da glicoproteína E viral ao receptor da célula hospedeira. Devido à capacidade dos flavivírus de infectar uma grande variedade de linhagens celulares em diferentes hospedeiros, sabe-se que esses vírus são aptos a utilizar múltiplos receptores celulares para o início de sua via de multiplicação. O receptor celular específico ainda não é caracterizado (BARRET, 2001; SMIT *et al.*, 2011; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

Posteriormente, a partícula viral é internalizada por endocitose via clatrina. A acidificação do endossomo induz mudanças conformacionais na proteína E desencadeando a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e consequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (LINDENBACH *et al.*, 2013; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

Após o desnudamento, etapa onde se observa a dissociação do RNA e capsídeo viral, inicia-se a replicação viral no citoplasma. Inicialmente, o RNA genômico de sentido positivo é traduzido em uma poliproteína, que em seguida será clivada gerando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, sendo essas últimas necessárias às etapas subsequentes do processo de replicação viral (BARRET, 2001; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015). A replicação é dependente da atividade de RNA-polimerase-RNA dependente (RdRp) da proteína viral NS5 juntamente com a protease/helicase NS3, e ocorre em associação com as membranas celulares do hospedeiro, onde o RNA viral é sintetizado em uma fita complementar com polaridade negativa que atua como molde para transcrição de novas fitas de RNA de sentido positivo (BARRET, 2001; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

A montagem das novas partículas virais transcorre próximo à superfície do retículo endoplasmático, a proteína do capsídeo e o genoma recém-sintetizado formam o nucleocapsídeo e os novos vírus adquirem o envelope viral com as proteínas prM e E (BARRET, 2001; LINDENBACH *et al.*, 2013; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015). As partículas imaturas (presença da proteína prM) são conduzidas pela via secretora da célula hospedeira para a rede trans-Golgi (TGN) onde ocorre maturação dessas partículas através da clivagem de prM em proteína M e do rearranjo da proteína E. Após essa etapa, as partículas infecciosas são transportadas em vesículas citoplasmáticas para a membrana plasmática e a nova progênie viral é liberada por exocitose no meio extracelular (Figura 5) (BARRET, 2001; LINDENBACH *et al.*, 2013; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

O início do ciclo de multiplicação do vírus da Febre Amarela pode ser verificado em um intervalo de 3 a 6 horas após a infecção, e as novas partículas virais são liberadas em torno de 12 horas depois. As células hospedeiras que podem ser consideradas permissivas à infecção por flavivírus são os monócitos, macrófagos, neurônios, células dendríticas e hepatócitos (GARDNER; RYMAN, 2010; LINDENBACH *et al.*, 2013).

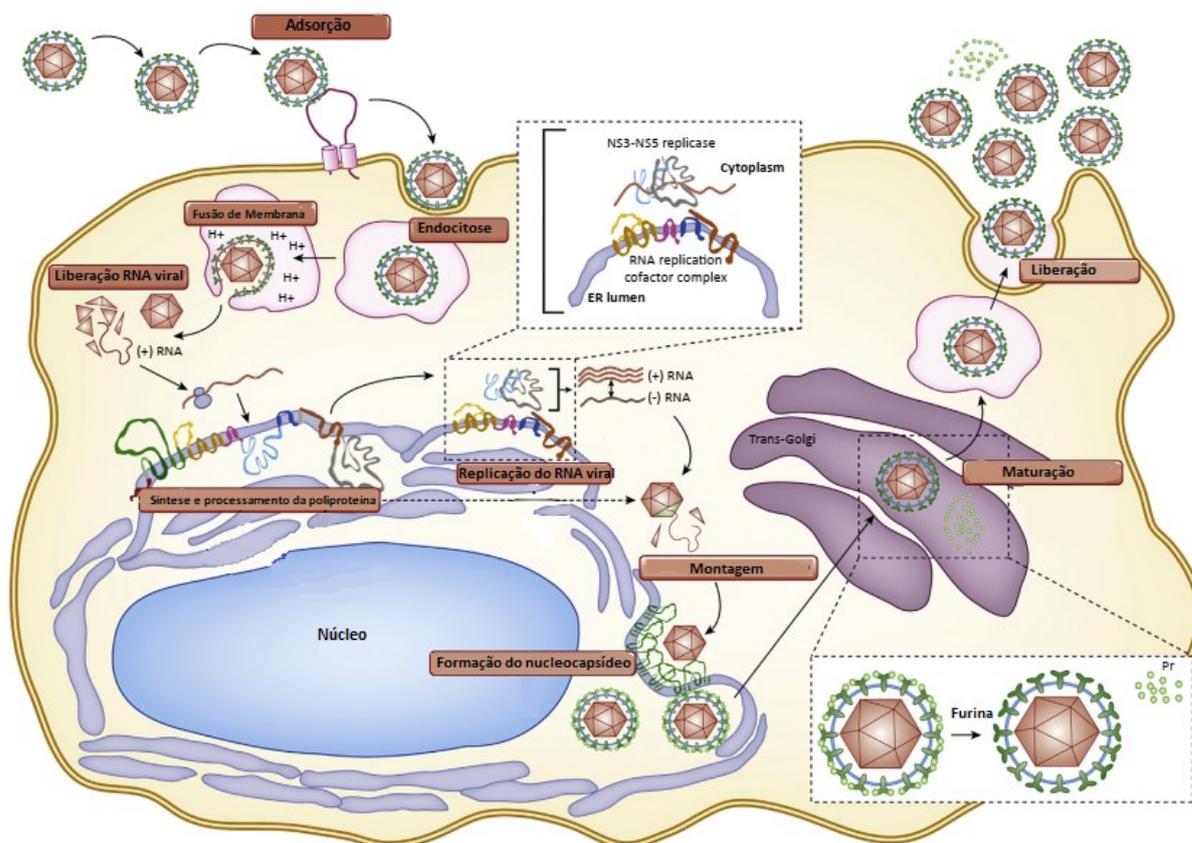


Figura 5: Ciclo de multiplicação do vírus da Febre Amarela (YFV). Na figura são destacadas as principais etapas do ciclo de multiplicação viral, desde a adsorção inicial até a maturação das novas partículas virais e liberação por exocitose. Fonte: Adaptado de DOUAM; PLOSS, 2018.

1.4 Variabilidade Genética

A partir de análises das sequências genômicas de genes estruturais e não estruturais do YFV são descritos atualmente sete genótipos do vírus, e estudos genéticos demonstraram que as variações genéticas observadas entre esses genótipos estão associadas com a localização geográfica dos mesmos (LEPINEIC *et al.*, 1994; MUTEBI *et al.*, 2001; MARFIN; MONATH, 2008). Dentre esses sete genótipos descritos, cinco são encontrados na África e dois na América do Sul. Estudos filogenéticos sugerem ainda, que o YFV teve sua origem na África Oriental ou Central, se disseminando para a África Ocidental e só então foi difundido para a América do Sul. Evidências que sustentam essa origem compreendem a maior heterogeneidade entre os genótipos encontrados na África e o fato das linhagens da África Ocidental serem filogeneticamente mais relacionadas às linhagens sul americanas (LEPINEIC *et al.*, 1994; MUTEBI *et al.*, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; MARFIN; MONATH, 2008).

Os cinco genótipos encontrados na África são Genótipo I da África Ocidental, Genótipo II da África Ocidental, Genótipo da África Oriental e Central, Genótipo do leste africano e Genótipo da Angola. Todos esses com localização geográfica distinta. Já na América do Sul os genótipos são conhecidos como Genótipo I da América do Sul, que abrange países como Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Panamá e Trindade e Tobago e Genótipo Sul-Americano II presente principalmente no Peru e Bolívia, com alguns relatos na Amazônia Brasileira e Trindade e Tobago (Figura 6) (MUTEBI *et al.*, 2001; BRYANT; BARRETT, 2003; BARRETT; HIGGS, 2007; MARFIN; MONATH, 2008; NUNES *et al.*, 2012).

Os genótipos de YFV circulantes na América do Sul constituem um grupo monofilético diferente do de seus ancestrais, e essa característica pode indicar que o vírus evoluiu de forma independente depois de ter sido introduzido no continente. Ademais, é considerável destacar que os surtos de Febre Amarela não ocorrem de forma uniforme nas áreas endêmicas, principalmente na África, e esse fato pode ser explicado pela variabilidade genética dos genótipos, que poderia estar associada a uma variação da virulência do YFV (MUTEBI *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2012; STOCK *et al.*, 2013).

De acordo com Stock e colaboradores (2013), grande parte dos estudos filogenéticos relacionados ao YFV foram realizados com base apenas em pequenas sequências do genoma desses vírus, e não analisando sequências completas do genoma. Ainda, segundo esses autores, quando estiverem disponíveis mais genomas completos das linhagens virais selvagens, a evolução molecular do YFV poderá ser mais bem compreendida.

Um exemplo é o estudo recente de Faria e colaboradores (2018), realizado durante o último surto de Febre Amarela silvestre no Brasil, o qual contribuiu com o sequenciamento de 62 genomas virais completos oriundos de humanos e primatas não humanos (PNH) infectados e concluiu que as linhagens do surto iniciado em dezembro de 2016 foram agrupadas em um único clado dentro do Genótipo I da América do Sul.

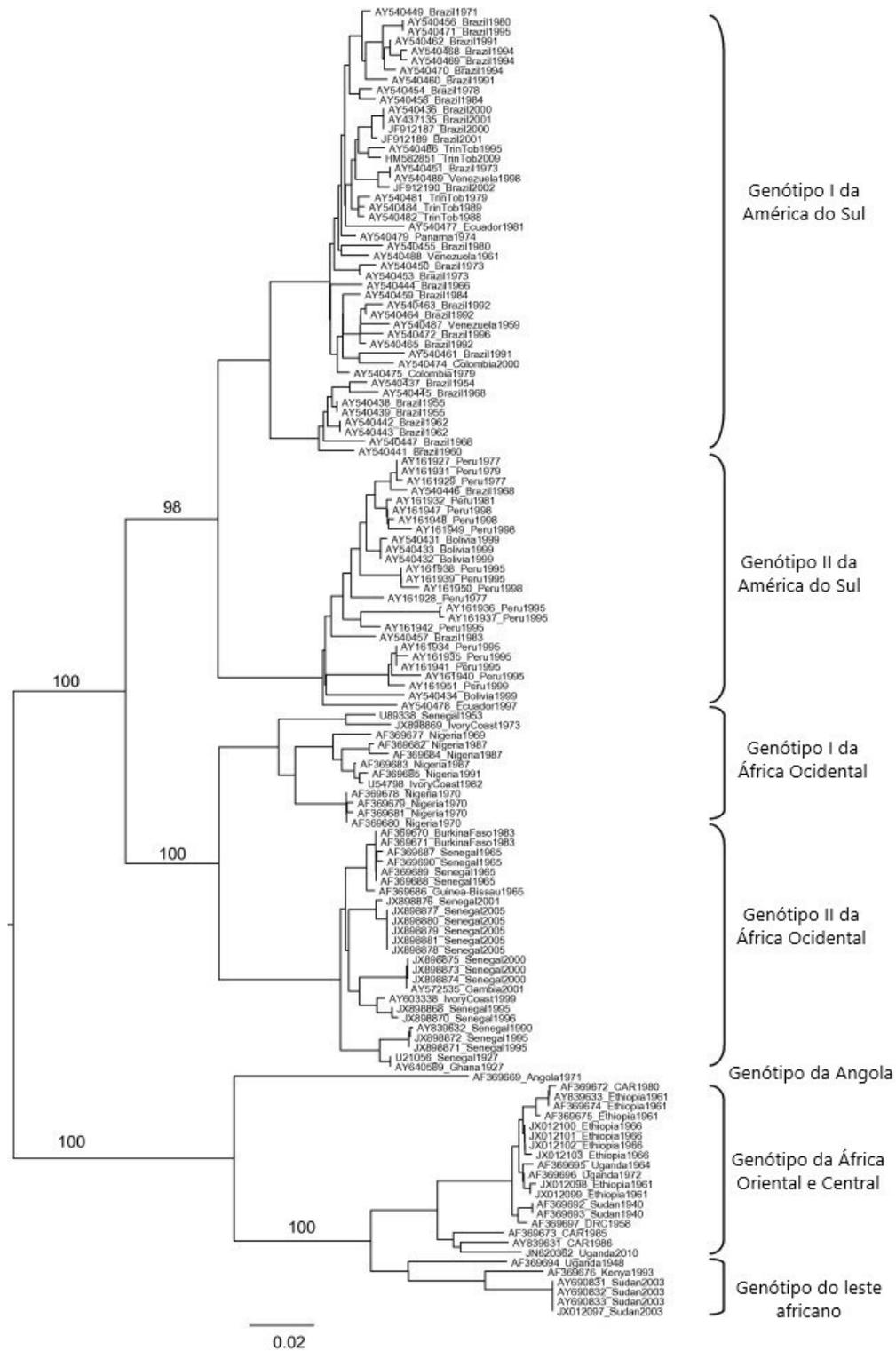


Figura 6: Árvore filogenética demonstrando os sete genótipos do YFV. A árvore foi construída tendo como base o alinhamento de uma região do gene prM/E, para 134 linhagens de YFV Africanos e Americanos. As linhagens são identificadas pelo número de acesso do Genbank e país/ano de isolamento. Fonte: BEASLEY *et al.*, 2015.

1.5 Febre Amarela

1.5.1 Histórico

A Febre Amarela (FA) é conhecida como a febre hemorrágica viral original, caracterizando-se como uma doença sistêmica capaz de desencadear quadros hemorrágicos e apresentar alta letalidade (MONATH, 2001; BRYANT *et al.*, 2007; BARRETT; HIGGS, 2007). Durante o período que abrange os séculos XV ao XIX foi uma das doenças epidêmicas mais temidas do mundo, sendo conhecida como “Black Vomit”, “Black Death” ou “Yellow Jack”. Estudos com base em sequenciamento genômico e análises filogenéticas sugerem que o YFV derivou de uma linhagem ancestral dos flavivírus há mais de 3000 anos (MONATH, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; BRYANT *et al.*, 2007; MARFIN; MONATH, 2008; KLITTING *et al.*, 2018).

A origem mais provável para o YFV está no continente Africano, e considera-se que o vírus foi introduzido e disseminado nas Américas através dos navios de comércio e tráfico negreiro no século XVI. Acredita-se que o vetor urbano da doença *Aedes aegypti* também tenha sido introduzido no Novo Mundo neste mesmo período (MUTEBI; BARRETT, 2002; BARRETT; HIGGS, 2007). Nas Américas, a primeira evidência de casos de Febre Amarela que se tem registros, data de 1648 em Yucatán, no México, onde um manuscrito Maia relatava sobre a ocorrência de sintomas característicos da doença como o “sxekik” (vômito preto). Desde o século XVIII até o início do século XX a Febre Amarela foi responsável por inúmeras epidemias na África, na América do Sul e Central, além de circular também em cidades portuárias da América do Norte, Caribe e Europa (MUTEBI; BARRETT, 2002; BARRETT; HIGGS, 2007; HANLEY *et al.*, 2013; MONATH; VASCONCELOS, 2015; CDC, 2018).

Epidemias de FA explodiram em várias cidades portuárias da América do Norte e do Sul, da Europa e África devido a múltiplas introduções do vírus por meio dos navios de comércio internacional. Das várias epidemias reportadas, algumas de destaque são a do ano 1793, na Filadélfia com aproximadamente 5000 mortes, a epidemia em Cádiz na Espanha, 1730, que ocasionou 2,220 óbitos e provocou surtos subsequentes em portos franceses e britânicos, além da epidemia registrada na guerra de Cuba, 1898, a qual matou mais soldados que o próprio conflito

(ECKERT *et al.*, 1993; BOLLET, 2005; BRYANT *et al.*, 2007; CDC, 2018; KLITTING *et al.*, 2018).

No Brasil, a primeira epidemia de Febre Amarela registrada ocorreu em 1685 em Recife, Pernambuco. Estima-se que nesse ano a doença tenha ocasionado a morte de aproximadamente 600 pessoas, e no ano seguinte 25.000 casos e 900 óbitos foram confirmados na Bahia. No ano de 1691 foi realizada a primeira campanha visando eliminar a FA no Brasil, e depois de 150 anos, no ano de 1849 ocorreu uma epidemia em Salvador, resultando em 2.800 mortes. A epidemia atingiu o Rio de Janeiro registrando em torno de 4.160 óbitos. A última epidemia urbana no país ocorreu no Rio de Janeiro em 1929, registrando 478 óbitos. Em 1942 foram registrados 3 casos no Acre, e desde esta data não há confirmação de ciclo urbano da doença no Brasil. Somente no ano de 1932 foi reconhecido o ciclo silvestre da Febre amarela no país, envolvendo primatas não humanos e outras espécies de mosquitos silvestres (BARRETT, 2001; SVS, 2004; COSTA *et al.*, 2011).

No final do século XIX, o médico Carlos Finlay propôs que a Febre Amarela era transmitida através da picada de mosquitos. Todavia, somente em 1900 Walter Reed e colaboradores demonstraram que o agente causador era um vírus filtrável e que esse era transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* (BARRETT, 2001; MONATH, 2001; MARFIN; MONATH, 2008).

O YFV foi o primeiro vírus animal com transmissão por artrópodes confirmada, porém, o vírus só foi isolado em 1927. O isolado obtido recebeu o nome de Asibi, por ter sido proveniente de um paciente Africano com esse nome. Na década de 1930, Max Theiler e colaboradores atenuaram o isolado Asibi através de 235-240 passagens em tecidos embrionários de galinha originando a linhagem atenuada denominada 17D. Mesmo com a existência de uma vacina, a FA ainda é considerada um problema de saúde pública nas áreas endêmicas, regiões tropicais da África e América do Sul, podendo ocasionar epidemias e altas taxas de mortalidade, além de representar perigo para viajantes que visitam essas localidades sem imunização prévia (BARRETT, 2001; MONATH, 2001; MARFIN; MONATH, 2008; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

1.5.2 Transmissão

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

São descritos três tipos de ciclos para a FA, sendo esses denominados ciclo silvestre, ciclo intermediário e ciclo urbano. No ciclo silvestre o vírus é mantido na natureza pela transmissão entre mosquitos silvestres e primatas não humanos em florestas tropicais da África e América do Sul. Na África este ciclo tem como principal vetor a espécie *Aedes africanus*, e na América os vetores principais neste ciclo são *Haemagogus janthinomys*, *H. leucocelaenus* e *Sabethes chloropterus*. Nos dois continentes os hospedeiros vertebrados divergem, sendo que no continente Americano as principais espécies descritas no ciclo de YFV são os bugios pertencentes ao gênero *Alouatta*. A principal espécie de primata envolvida no ciclo da doença na África Oriental e Central é *Colobus abyssinicus*, sendo que em florestas e savanas merecem destaque os primatas do gênero *Cercopithecus*. Outro fator a ser considerado é que as espécies de PNH das Américas geralmente sofrem de Febre Amarela fatal, enquanto no continente Africano os hospedeiros apresentam a infecção de forma mais branda, em muitos casos infecções subclínicas. Neste ciclo silvestre casos humanos podem ocorrer de forma esporádica, quando o homem adentra nessas áreas de mata (BARRET, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; GARDNER; RYMAN, 2010).

Na África também pode ser caracterizado um ciclo intermediário, ou também denominado ciclo de Savana. Esse ciclo ocorre em áreas úmidas de savana próximas a áreas de florestas tropicais, com a presença de atividades humanas como aldeias rurais e terras agrícolas. Nesse ciclo, os mosquitos vetores se alimentam tanto em primatas não humanos quanto em humanos, e as espécies mais presentes são *Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer*, *Aedes metallicus*, *Aedes opok*, *Aedes taylori*, *Aedes vittatus*, e membros do complexo *Aedes simpsoni* (MUTEBI; BARRETT, 2002; BARRETT; HIGGS, 2007; MARFIN; MONATH, 2008).

O ciclo urbano caracteriza-se pela transmissão do YFV entre humanos pelo *Aedes aegypti*. Esse ciclo é motivo de notável preocupação pois pode facilmente desencadear epidemias. Nesse ciclo, o principal hospedeiro é o homem e a transmissão da doença pode acontecer de forma mais rápida, devido à alta densidade do mosquito vetor e a possível limitada imunização dos indivíduos residentes em áreas urbanas. Na África a presença de epidemias urbanas é mais comum, no entanto, na América do Sul esse ciclo não tem sido reportado desde 1942 (Figura 7) (MUTEBI; BARRET, 2002; BARRETT; HIGGS, 2007; OMS, 2016).

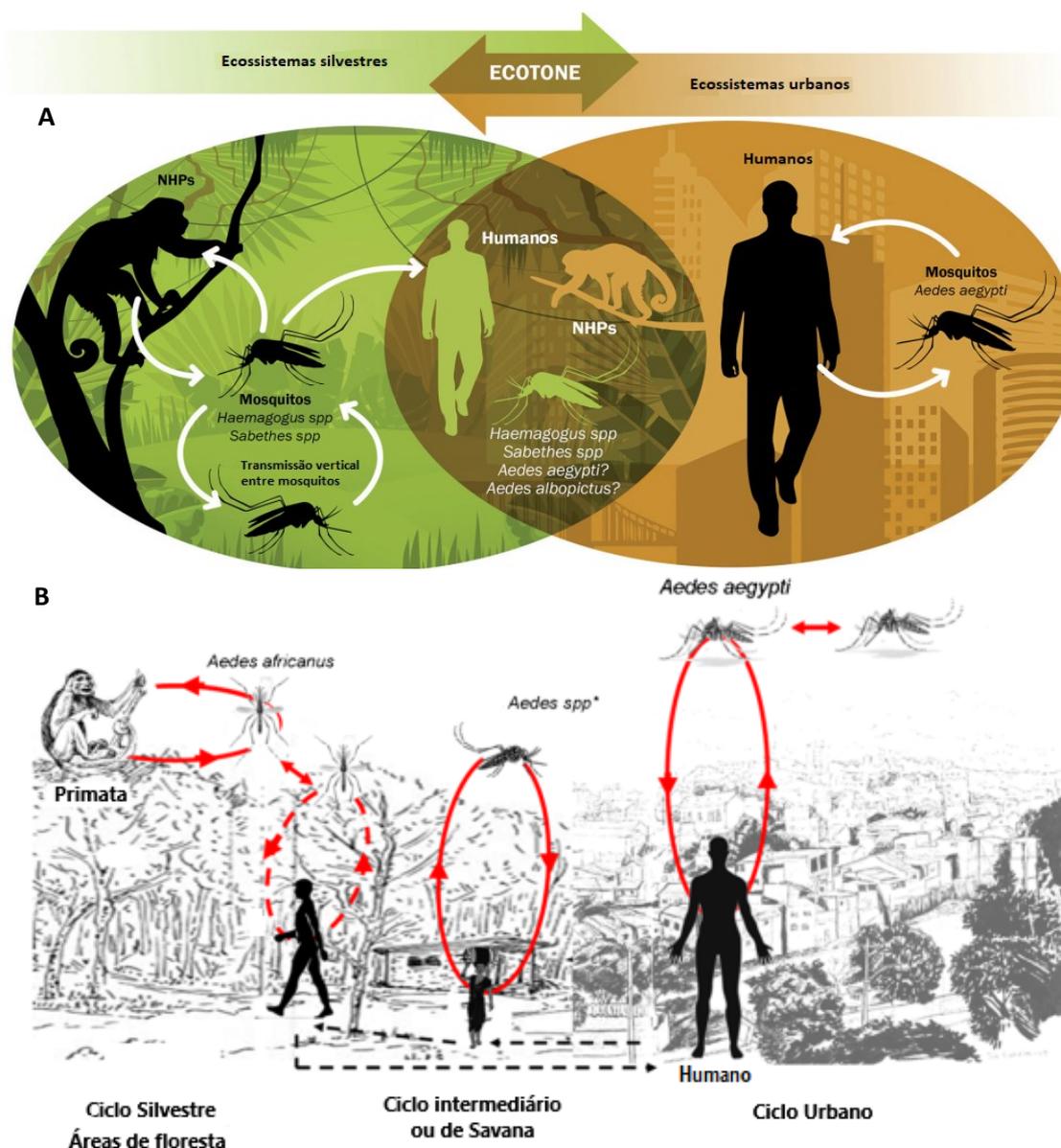


Figura 7: Ciclos de transmissão da Febre Amarela na América do Sul e África. Nos dois diagramas são demonstrados os ciclos de transmissão do YFV nos diferentes continentes endêmicos, (A) América do Sul e (B) África. São destacadas as diferenças com relação aos hospedeiros, ambientes e vetores. Fonte: Adaptado de QUARESMA *et al.*, 2013; POSSAS *et al.*, 2018.

1.5.3 Patogênese e aspectos clínicos

Sendo a Febre Amarela classificada como uma arbovirose, o vírus é inoculado no hospedeiro vertebrado por meio da picada do mosquito vetor infectado, posteriormente a replicação viral inicial ocorre próxima ao local de inoculação e nos linfonodos regionais. Em seguida, verifica-se a viremia, onde as partículas virais disseminam-se pelos vasos linfáticos para a corrente sanguínea e assim para outros órgãos como fígado, rins, coração, pâncreas, baço, medula óssea e sistema nervoso central. O fígado é o órgão mais afetado, assim que o YFV alcança esse órgão as células de Kupffer (macrófagos hepáticos) e os hepatócitos são os alvos da infecção (BARRETT, 2001; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

Durante o curso da infecção o fígado apresenta inchaço e aumento de volume, pode ser observada a presença de necrose médio-sazonal dos lóbulos hepáticos e esteatose. O YFV induz lesão hepatocelular e a apoptose celular é o principal mecanismo de morte celular ocasionado pelo vírus. Também é observada a formação dos corpúsculos intracitoplasmáticos de Councilman (degeneração eosinofílica) característicos da Febre Amarela. A necrose do órgão tem como consequência a perda de função hepática e a icterícia, e casos de hemorragia ocorrem devido a escassa síntese de fatores de coagulação (BARRETT, 2001; MONATH, 2005; QUARESMA *et al.*, 2013; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

Quando o vírus atinge os rins, esses também demonstram volume aumentado, e é perceptível edema. As encefalites por YFV são raras, porém quando o cérebro é afetado são observados edemas e hemorragias petequiais. As lesões presentes nos órgãos acometidos pela infecção podem ser decorrentes do efeito citopático viral, da condição de hipóxia e da resposta imune do hospedeiro (MONATH, 2001; QUARESMA *et al.*, 2006; GARDNER; RYMAN, 2010; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

A replicação viral intensa no fígado e consequente apoptose dos hepatócitos é considerada uma das características mais significativas da infecção pelo YFV. Entretanto, vários estudos apontam que além do efeito citopático provocado pelo vírus, a resposta imune em si através de uma resposta sistêmica e por vezes não balanceada, com tempestade de citocinas se torna um dos principais motivos da hepatotoxicidade e do quadro clínico observado no decorrer da infecção (TER MEULEN *et al.*, 2004; QUARESMA *et al.*, 2013; DOUAM; PLOSS, 2018).

Nas infecções causadas pelo YFV o quadro clínico pode variar de uma doença leve, com sintomas inespecíficos e febre, até uma doença grave potencialmente letal, onde estão presentes quadros de insuficiência hepática e renal, hemorragia e choque. Devido a variação dos quadros clínicos, estima-se que a FA se apresente de forma assintomática e de leve a moderada em até 90% dos casos, e que apenas 10% dos casos se tornam graves com elevada letalidade. Ainda, devido à grande subnotificação de casos a doença apresenta o padrão de um iceberg, com as infecções graves representando apenas a ponta do iceberg do total de casos (Figura 8) (VASCONCELOS, 2002; VASCONCELOS, 2003; MONATH, 2005).



Figura 8: Iceberg das infecções por Febre Amarela. São demonstrados na pirâmide as porcentagens de ocorrência das formas clínicas da FA, com destaque para a porcentagem significativa de infecções assintomáticas. Fonte: VASCONCELOS, 2003.

A doença grave é denominada Febre Amarela clássica, e é caracterizada como uma doença trifásica. O período de incubação da enfermidade varia de 3 a 6 dias, e após esse período os sintomas surgem de forma súbita. Esses sintomas são febre alta variando de 39°C a 40°C, cefaleia, dores musculares, cansaço, náuseas, vômitos, tonturas, prostração e calafrios. Essa fase inicial é denominada como período de infecção, considerada o período de viremia, no qual o YFV está presente na circulação sanguínea do paciente em títulos de até 10^5 - 10^6 partículas infecciosas/mL, suficiente para o indivíduo servir de fonte de infecção para mosquitos vetores. Esse período ocorre em um intervalo de 3 a 5 dias e é acompanhado por um período de remissão que dura em torno de 2 dias, no qual a

febre diminui e os sintomas desaparecem ou é observada melhora do quadro clínico. É durante essa fase de remissão que a maioria dos casos tem resolução. Segundo Monath (2001), em 15 a 25% dos pacientes inicia-se o período de intoxicação, onde os sintomas reaparecem e a doença apresenta-se de forma grave. Nessa fase são observados novamente febre e vômitos (pode ser hemorrágico, conhecido como vômito negro) além de manifestações como dor epigástrica, insuficiência hepatorenal acompanhada de icterícia, anúria e hemorragias. Nesses casos graves ocorrem ainda manifestações como choque, coma, convulsões, hipotensão e dificuldade respiratória, seguidas pelo óbito que ocorre geralmente na segunda semana desde o início dos sintomas (Figura 9) (BARRETT, 2001; MONATH, 2001; MARFIN; MONATH, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

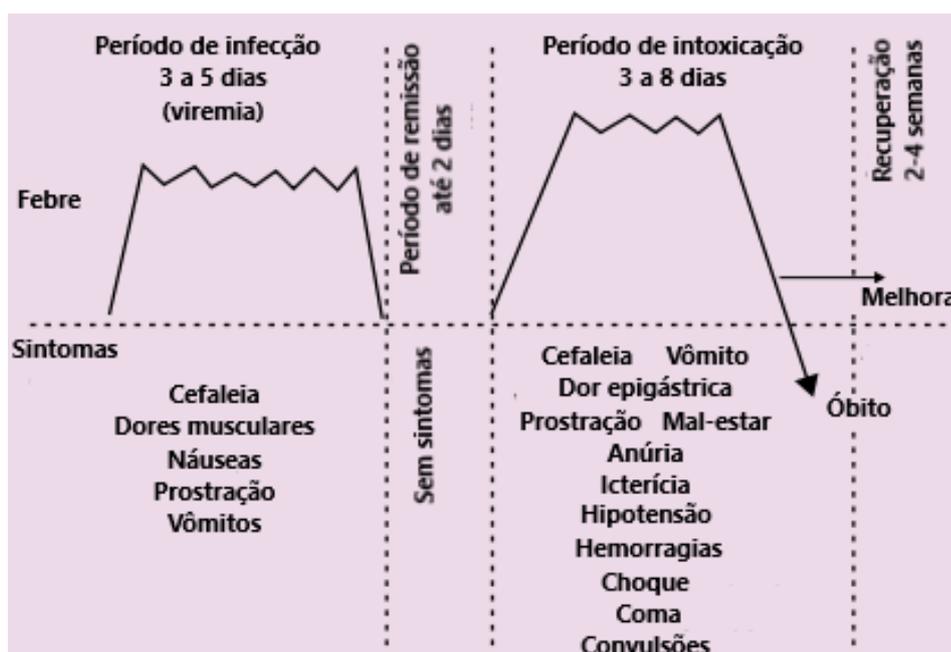


Figura 9: Diagrama demonstrando as fases da infecção por Febre Amarela. São evidenciados os períodos de infecção (viremia), período de remissão, intoxicação e período de recuperação ou óbito. Fonte: Adaptado de MONATH, 2001.

1.5.4 Epidemiologia

A Febre Amarela é endêmica nas regiões tropicais da América do Sul e da África. É considerada uma doença emergente devido ao aumento do número de casos nos últimos 25 anos, mesmo com a existência de uma vacina efetiva. A cada ano são relatados cerca 5000 casos dessa febre hemorrágica viral na África e 300

na América do Sul, porém acredita-se que esses números são subestimados e a incidência real seja de 10-50 vezes maior, em torno de 200.000 casos por ano acompanhados por cerca de 30.000 mortes, com prevalência de 90% dos casos ocorrendo na África (BARRETT, 2001; MONATH, 2001; BARRETT; HIGGS, 2007; PAHO, 2014; MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Atualmente, a circulação do YFV é relatada em 44 países, 34 da África e 11 da América do Sul. A Figura 10 demonstra as áreas com circulação viral e recomendação de vacinação para FA nesses continentes. Na África em torno de 600 milhões de pessoas estão em risco, e a ocorrência de epidemias é mais frequente, e embora a área endêmica seja extensa a distribuição de casos não é uniforme sendo que na África Ocidental são reportados mais casos em comparação com a África Oriental. A ocorrência de surtos urbanos da doença é mais comum nesse continente devido à elevada densidade dos vetores e da proximidade desses com populações humanas não vacinadas, ou com cobertura vacinal limitada (MUTEBI; BARRETT; 2002; BARNETT, 2007; BARRETT; HIGGS, 2007; WHO, 2016).

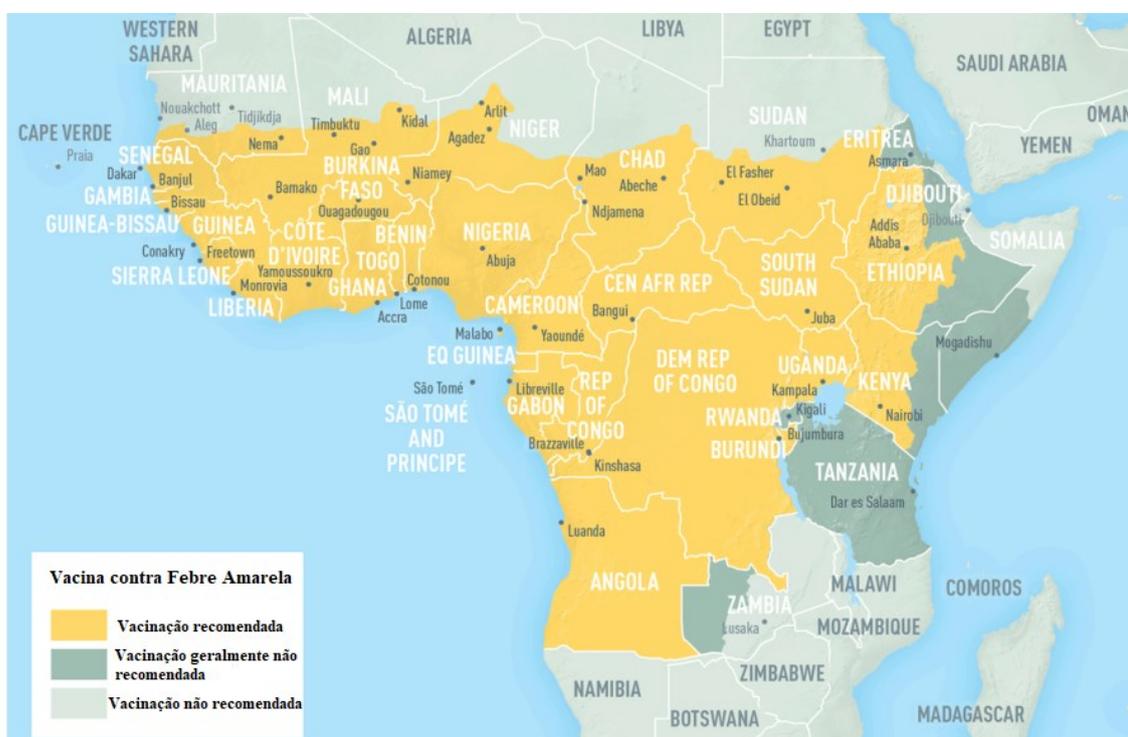




Figura 10: Mapas da África e América do Sul demonstrando os países onde o YFV está presente e os locais com recomendação de vacinação. Em laranja, áreas com recomendação de vacinação, áreas com vacinação geralmente não recomendada (cinza escuro), locais sem recomendação de vacina (cinza claro). Para o Brasil em vermelho, área com recomendação de vacinação desde 2017. Fonte: CDC, 2018.

Na América do Sul o YFV é encontrado principalmente nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas e Araguaia. Os países mais afetados nesse continente são Brasil, Peru, Bolívia e Colômbia, os quais apresentam em torno de 90% dos casos. Todavia também são considerados endêmicos e apresentam condições para a transmissão do YFV países como Equador, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela, Trindade e Tobago, e além destes já foram reportados casos na

Argentina, Paraguai e Panamá. A transmissão urbana do YFV em todo continente é mais baixa em relação à África, essa característica pode estar relacionada à melhor implantação e efetividade dos programas de vacinação locais. Na América do Sul a transmissão ocorre de forma mais acentuada no ciclo enzoótico em áreas de florestas tropicais. Nessas regiões a densidade populacional é reduzida e, dessa forma a FA afeta principalmente seres humanos que trabalham próximos a essas áreas florestais e populações rurais vizinhas. A doença apresenta caráter sazonal e normalmente o período com maiores taxas de transmissão é de dezembro a maio, onde a estação chuvosa culmina com o aumento da população de vetores (TOMORI, 2004; BARNETT, 2007; BARRETT; HIGGS, 2007; PAHO, 2014; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

A doença tem um caráter zoonótico e normalmente os casos identificados em humanos são precedidos por epizootias (transmissão intensa de um agente patogênico entre os animais hospedeiros naturais) em primatas não humanos. Assim, a ocorrência de epizootias se mostra como um alerta para a circulação do YFV e possível transmissão para os seres humanos sendo os primatas não humanos considerados animais sentinelas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em virtude do potencial da Febre Amarela de desencadear epidemias e se dispersar facilmente, a doença deve ser obrigatoriamente reportada às autoridades de saúde pública. No Brasil, a FA é caracterizada como uma doença de notificação compulsória, onde todos os casos suspeitos devem ser reportados imediatamente para posterior investigação epidemiológica. O Programa de Vigilância da FA no país possui diversos eixos de atuação e mostra-se abrangente com programas de vigilância de casos humanos suspeitos, vigilância de síndromes febris íctero-hemorrágicas, vigilância entomológica (vetores urbanos e silvestres), vigilância ambiental (ecoepidemiologia), e desde 1999 a vigilância de epizootias de PNH. A agilidade e rigor no processo de vigilância e a análise desses dados auxilia na adoção de medidas adequadas para prevenção e controle de surtos na população (TUBOI *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014A).

Nos últimos anos houve um aumento do número de casos de FA reportados na América do Sul. Esse cenário pode ser explicado por alguns fatores como maiores taxas de urbanização e expansão da população humana, baixa cobertura vacinal em regiões com surtos da doença, possível presença de vetores silvestres

eficientes em habitats periurbanos degradados, além de ausência de cobrança de certificado de vacinação para viajantes. No Brasil a circulação viral também aumentou e entre os anos de 2002 e 2008, sendo observada a expansão de áreas com circulação do YFV no sentido leste e sul do país. Diante disso, a partir de 2008, o Ministério da Saúde redefiniu a classificação das áreas com circulação do vírus no país, as antigas denominações de área endêmica, área de transição e área indene foram substituídas por área com recomendação de vacina (ACRV) e área sem recomendação de vacina (ASRV) (BARNETT, 2007; BARRETT; HIGGS, 2007; MARFIN; MONATH, 2008; GARDNER; RYMAN, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em dezembro de 2015, foi reportado um surto de FA urbana em Angola, África, o surto atingiu a República Democrática do Congo, sendo confirmados 879 casos e 119 óbitos até julho de 2016. A maioria dos casos ocorreu em Luanda, a capital do país, mas também foram confirmados casos em outras 16 províncias. Não obstante, a epidemia de Angola alcançou áreas não endêmicas através de viajantes que voltaram para seus países com a infecção. Foram registrados 11 casos da doença na China e dois no Quênia. Essa disseminação internacional, principalmente por meio de viagens aéreas, mostra o quanto é importante o controle dos surtos dessa doença de alta letalidade, além de demonstrar o quanto é indispensável a vacinação de turistas (VASCONCELOS; MONATH, 2016; WHO, 2016; ORTIZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017; PAULES; FAUCI, 2017).

Após a epidemia de Angola, a Febre Amarela foi incluída na lista do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dos principais arbovírus que apresentam ameaça à saúde humana. Além disso, ainda segundo o CDC, a FA é uma ameaça potencial a ser monitorada, principalmente devido a capacidade de ocasionar epidemias, sendo que epidemias ainda mais expressivas podem ser ocasionadas quando indivíduos infectados estão inseridos em áreas densamente povoadas com o vetor urbano *Ae. aegypti* (CHRISTIAN *et al.*, 2017).

Segundo BARRETT (2007), a epidemiologia da Febre Amarela está diretamente relacionada a distribuição geográfica do mosquito vetor. Além disso, a epidemiologia da doença é complexa podendo apresentar variações de acordo com mudanças climáticas, como alteração de padrões de precipitação, e com fatores relacionados ao homem como urbanização, migração, viagens aéreas e cobertura vacinal (MUTEBI; BARRETT; 2002; JENTES *et al.*, 2011).

Muitas regiões não endêmicas para a FA podem ser altamente susceptíveis a manutenção dos ciclos da doença, principalmente países que apresentam alta densidade populacional e a presença das espécies de mosquitos vetores e PNH susceptíveis. Nessas regiões o monitoramento da doença e dos viajantes deve ser efetivo, pois a importação do YFV por um indivíduo pode desencadear em um ciclo de transmissão enzoótico e ocasionar risco de FA urbana na população. Áreas com elevado risco de introdução do YFV e que apresentam alta densidade do vetor urbano *Aedes aegypti* são: Ásia, Caribe, América Central e regiões costeiras da América do Sul, outros países onde o YFV pode ser introduzido são Estados Unidos e Austrália (TUBOI *et al.*, 2007; JENTES *et al.*, 2011).

Ainda, segundo a Organização Mundial da Saúde, se forem ocasionados surtos urbanos da FA com transmissão entre humanos pelo vetor *Aedes aegypti*, a doença apresenta elevado potencial de dispersão e poderia ser facilmente dispersada internacionalmente. Ademais, além do desmatamento e abertura de áreas para agricultura, possíveis fatores que estariam relacionados ao maior risco de epidemias urbanas e dispersão internacional seriam a urbanização, grande movimentação de populações, mudanças climáticas e maior exposição de seres humanos que trabalham em áreas próximas a matas com os reservatórios animais (PNH) e mosquitos vetores (WHO, 2017).

1.5.5 Reemergência de 2016-2018 no Brasil

Em dezembro de 2016, iniciou-se no Brasil uma das mais significativas epidemias de Febre amarela silvestre já reportadas, com ocorrência de casos em regiões que historicamente apresentavam pouca ou nenhuma circulação do YFV. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde desde o ano de 1980 compõe uma série histórica da doença, e desde então o surto atual é o maior já registrado (Figura 11). De acordo com dados do Ministério da Saúde, no período de monitoramento de julho de 2016 a junho de 2017 foram registrados 779 casos de Febre Amarela em humanos, e 262 óbitos, já no período de 2017 a 2018 foram registrados 1.376 casos e 483 óbitos. Sendo que nesse último período de monitoramento a taxa de letalidade foi de 35,1% (DOUAM; PLOSS, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

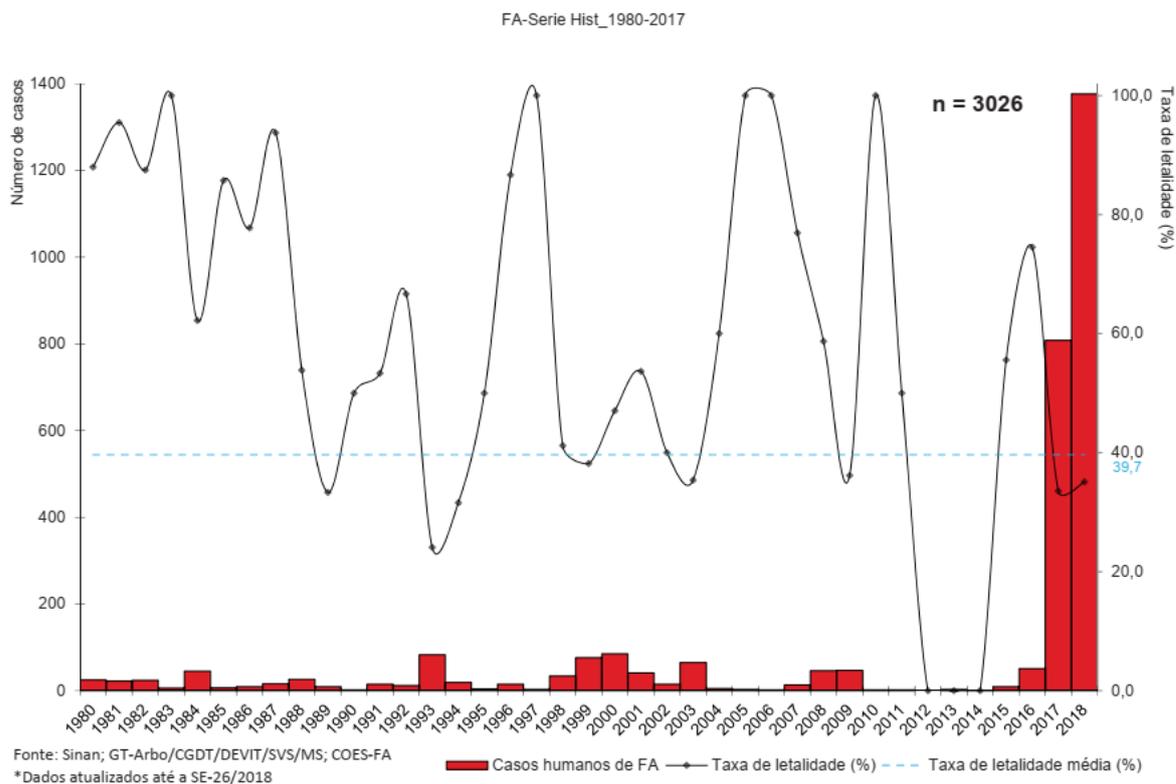


Figura 11: Série histórica da FA no Brasil. Gráfico com série histórica do número de casos confirmados para FA e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, 1980 a junho de 2018. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018.

Diante do cenário atual, com inúmeros casos de FA registrados além da região amazônica, sabe-se que ocorreu a expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país. Durante os anos de 2014-2015 ocorreram casos de FA na região norte do país, já em 2015/2016 foram reportados casos na região Centro-oeste e entre 2016-2018 iniciou-se o surto atual na região Sudeste (MONATH, 2015; FARIA *et al.*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; POSSAS *et al.*, 2018; REZENDE *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o YFV se deslocou da região amazônica, se estendeu pelo bioma de Cerrado e alcançou áreas de Mata Atlântica (Figura 12), as quais apresentam uma diversidade de espécies de PNH e de possíveis vetores silvestres. Destacando também que essas áreas de Mata Atlântica são regiões próximas à grandes centros urbanos, onde a população apresenta baixa cobertura vacinal para FA (ROMANO *et al.*, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; POSSAS *et al.*, 2018).



Figura 12: Disseminação do YFV pelos biomas brasileiros. A linha preta representa o deslocamento de 1980 até 2010, e a linha branca a disseminação viral a partir da primeira metade da década de 2010, além da epidemia em curso a partir de 2016. Fonte: POSSAS *et al.*, 2018.

Ainda, segundo dados de Faria e colaboradores (2018), quando foram notificados os primeiros casos em Minas Gerais em dezembro de 2016, a expansão territorial do surto e a disseminação do YFV para o sentido sul, onde viria a alcançar o Rio de Janeiro e São Paulo já estava acontecendo. A linhagem viral já circulava por meses entre os PNH em uma grande extensão geográfica antes que os casos humanos fossem notificados.

Os estados mais afetados foram Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo, todos incluídos na região sudeste do país. Sendo que no período de monitoramento de 2017/2018 os estados com maior número de casos foram São Paulo e Minas Gerais, com 555 e 532 casos confirmados respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

No estado de Minas Gerais durante os últimos 20 anos (1989-2009) foram confirmados 150 casos de FA silvestre. No início dos anos 2000 ocorreram dois surtos importantes no estado, o primeiro em 2000 e 2001 no centro-oeste mineiro,

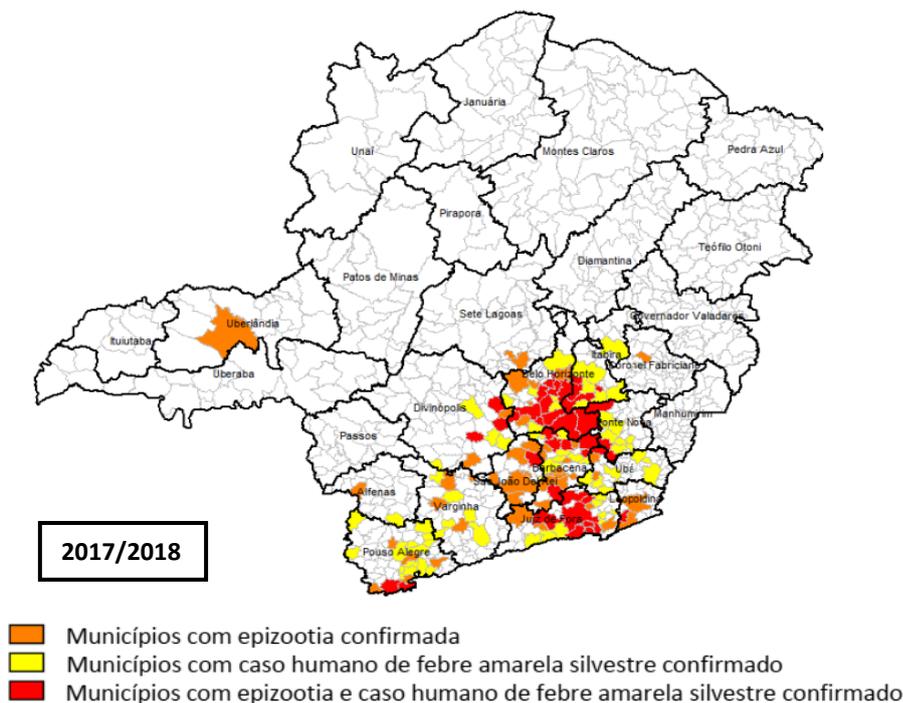


Figura 13: Mapas de Minas Gerais com a distribuição de casos humanos e epizootias confirmadas nos períodos de monitoramento de 2016/2017 e 2017/2018. Fonte: Adaptado de SES/MG, 2018.

Diante do cenário de aumento exponencial de casos de FA silvestre, o Ministério da Saúde distribuiu desde janeiro de 2017 68,9 milhões de doses da vacina para todos os estados. Em 2017 foram 45,1 milhões de doses, e até o momento 23,8 milhões de doses em 2018. Outra importante medida adotada pelo Ministério da Saúde e sustentada pela Organização Mundial de Saúde foi a administração de doses fracionadas da vacina nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia. Devido a situação emergencial, a confirmação de casos nesses estados densamente povoados e a presença da circulação viral, a utilização das doses fracionadas visou proteger a maior parcela possível da população, e assim evitar a expansão da circulação viral e o aumento do número de casos da doença. Essa campanha que utiliza doses fracionadas da vacina contra a FA, um quinto (1/5) de uma dose padrão (0,5 mL), é até o momento a maior campanha de vacinação do mundo nessas condições (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; PAHO, 2018).

Diante de todo esse panorama de reemergência da Febre amarela no país um dos maiores desafios para o enfrentamento da epidemia é atingir o patamar de 95% de cobertura vacinal da população preconizado pelo Ministério da Saúde. A

vacinação é a medida mais eficaz para prevenção e controle da doença, porém com a expansão da área de circulação do vírus ao longo das últimas décadas, muitas áreas onde anteriormente a vacina não era recomendada (ASRV) foram acometidas. Nesse contexto, desde 1997 o Ministério da Saúde vem alterando as áreas de recomendação de vacinação (ACRV), sendo que para o período de monitoramento de 2018/2019 quase todo o território nacional é considerado como área de recomendação de vacinação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Muitas são as hipóteses que buscam explicar a reemergência de casos de FA no Brasil e o rápido deslocamento viral pelo país, mas sabe-se que a epidemiologia da FA é complexa e esse cenário apresenta causa multifatorial. A recente epidemia de Febre Amarela no Brasil sinaliza para possíveis falhas na vigilância epidemiológica relacionada a enfermidade, para o aumento da proximidade de populações humanas em áreas com circulação viral e para a ausência de imunização em possíveis áreas de risco. Esses fatores somados ao aumento da temperatura, chuvas, clima e o aquecimento global, além do aumento na densidade populacional de vetores e mutações virais podem favorecer a reemergência de casos em áreas anteriormente consideradas livres da doença (DOUAM; PLOSS, 2018; POSSAS *et al.*, 2018; REZENDE *et al.*, 2018).

A proximidade da epidemia com as metrópoles brasileiras colocou aproximadamente 35.8 milhões de pessoas em risco no país. Embora não tenham sido registrados casos de febre amarela urbana, o surto provocou grande preocupação para o risco de reurbanização da doença devido à elevada densidade de *A. aegypti* nos grandes centros urbanos do país o que poderia contribuir para o início de um ciclo urbano, onde a baixa cobertura vacinal e a consequente susceptibilidade das populações poderiam facilitar a transmissão viral (COUTO-LIMA, 2017; PAULES; FAUCI, 2017; KLITTING *et al.*, 2018).

1.5.6 Vacinação e prevenção

Anteriormente ao desenvolvimento das vacinas, a Febre Amarela era considerada como uma das doenças mais temidas pela humanidade, principalmente devido a algumas de suas características como a alta letalidade, o potencial de causar epidemias, o modo de transmissão e a habilidade de dispersão por várias regiões e fronteiras. Além disso, até o momento não existe terapia antiviral contra a

FA, sendo assim a vacinação é considerada a medida mais eficaz para a prevenção dessa infecção (MONATH, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; BARRETT, 2017).

Após o sucesso do primeiro isolamento do vírus, a amostra Asibi em 1927, foram iniciadas pesquisas para a produção de uma vacina. Nesse sentido, após a descoberta de que a realização de passagens do vírus em tecidos animais reduzia sua virulência, as pesquisas foram direcionadas para a produção de uma vacina viva atenuada. Porém, além da diminuição da virulência deveria ser garantido que após as passagens o vírus atenuado perderia seu viscerotropismo e a competência em mosquitos vetores (BARRETT, 2009; PULENDRAN, 2009; BARRETT, 2017). Na época, duas vacinas foram desenvolvidas. Uma foi produzida por pesquisadores franceses que utilizaram uma linhagem viscerotrópica francesa do vírus selvagem (isolado de Françoise Mayali no Senegal em 1928) para desenvolver a vacina neurotrópica francesa, por meio da passagem viral em culturas de cérebros de ratos. A vacina francesa foi bastante utilizada, mas a passagem no cérebro de ratos fez com que a vacina tivesse um potencial neurotrópico, sendo que uma alta taxa de encefalite pós-vacinal foi observada em crianças, e assim posteriormente o uso dessa vacina foi interrompido em 1980. A segunda é a vacina utilizada até hoje que foi derivada da estirpe Asibi, e foi desenvolvida em 1937 por Max Theiler e colaboradores. Essa estirpe foi atenuada por uma série de passagens em tecidos de embriões de ratos e galinhas, e é denominada estirpe 17D. A cepa vacinal 17D apresentou as características ideais de uma vacina atenuada, a perda de viscerotropismo, neurotropismo e competência nos vetores, além de demonstrar imunogenicidade e capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra o YFV (BARRETT, 2009; PULENDRAN, 2009; BARRETT, 2017).

A vacina 17D é considerada uma vacina segura, que proporciona imunidade eficaz e duradoura. É uma das vacinas atenuadas mais antigas, sendo utilizada há pelo menos 75 anos e com mais de 540 milhões de doses utilizadas. A vacina é altamente imunogênica e é intensamente utilizada para proteger as populações de áreas endêmicas. Atualmente são utilizadas duas sub-linhagens de 17D, a 17DD e 17D-204 as quais possuem números diferentes de passagens, 235-240 e 287-289 respectivamente, mas não apresentam diferença significativa quanto à segurança e imunogenicidade. No Brasil é utilizada a 17DD, sendo produzida em ovos embrionados de galinha livres de patógenos, pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

(BARRETT, 2009; PULENDRAN, 2009; MONATH, 2012; MONATH; VASCONCELOS, 2015; BARRETT, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A vacina é indicada para todos os indivíduos que vivem em áreas endêmicas, a partir dos 9 meses de idade até os 59 anos, além de pessoas que se deslocam para tais áreas. Em situações epidêmicas a recomendação é para vacinação a partir dos 6 meses de idade. De acordo com a recomendação atual da OMS, não são necessárias doses de reforço a cada 10 anos, apenas uma dose da vacina já é suficiente para garantir imunidade por toda a vida (ROMANOS; CAVALCANTI, 2015; OMS, 2016).

A recomendação de apenas uma dose da vacina, principalmente em áreas endêmicas gera discussões. Fatores que devem ser levados em consideração são, a queda no nível de anticorpos neutralizantes gerados pela vacina após a primeira vacinação, que em adultos e crianças pode diminuir significativamente após 4 ou 8 anos decorrida a primeira imunização. Além do fato de já terem sido reportados casos de infecção por FA em indivíduos vacinados previamente (CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2016; PAHO, 2016; FARIA *et al.*, 2018).

Assim, estudos recentes sugerem que no Brasil pelo menos mais uma dose da vacina 17DD deve ser administrada após a primeira imunização, visando evitar a queda na soropositividade. Diante da atual situação da epidemia no país, a prioridade é vacinar a maior parcela da população, porém recomenda-se que após esse período de emergência a população receba mais uma dose completa da vacina, reforçando a ideia de que duas doses são necessárias (CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2016; ESTOFOLETE; NOGUEIRA, 2018; VASCONCELOS, 2018).

Em regiões de risco é fundamental vacinar o maior número de pessoas possível, a fim de se evitar ao máximo a transmissão. Algumas medidas para potencializar a vacinação são: a inclusão da vacina de FA nos programas de vacinação infantil, campanhas de vacinação em massa em períodos inter-epidêmicos e em resposta a surtos ou epizootias, além da vacinação de turistas (PAHO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Ainda, visando evitar a transmissão da FA para áreas não endêmicas alguns países podem exigir um certificado internacional de vacinação contra a FA para os viajantes. A vacina é contraindicada em alguns casos como: pessoas que tem alergia a componentes da vacina, crianças menores de 6 meses de idade, mulheres grávidas e lactantes (exceto durante surtos de FA), pessoas com estado de saúde comprometido e com doenças febris agudas,

pacientes soropositivos para HIV, pacientes com neoplasias, submetidos à quimioterapia e radioterapia, transplantados, além de pessoas com doenças do timo e imunodepressão de qualquer natureza (PAHO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015; OMS, 2016; BARRETT, 2017; PAHO, 2017).

Podem ser relatados efeitos adversos após a vacinação, sendo comuns a presença de febre baixa, dor no local da vacina, mal-estar, cefaleia e mialgia. Essas manifestações ocorrem em 2 a 5% dos vacinados até 10 dias pós vacinação. A vacina é considerada bastante segura, sendo que reações adversas graves são raras (1 por 250.000 ou 500.000 vacinas). Merecem destaque dois tipos de eventos adversos graves, sendo eles a doença neurotrópica associada à vacina (YEL-AND, yellow fever vaccine-associated neurotropic disease) e a doença viscerotrópica associada à vacina (YEL-AVD, yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease). A YEL-AND caracteriza-se pela invasão do sistema nervoso central pelo vírus vacinal, podendo ocasionar encefalite, meningite e doenças autoimunes com envolvimento do SNC e periférico, a taxa de mortalidade é menor que 5% e a maioria dos casos relatados ocorreram em menores de 6 meses. Com relação a YEL-AVD, esta é caracterizada por uma infecção sistêmica onde o vírus vacinal se dissemina para vários órgãos, podendo causar choque e falência múltipla de órgãos. A doença viscerotrópica associada à vacina apresenta manifestações semelhantes a infecção natural por YFV, como início rápido de febre alta, oligúria, icterícia e hemorragias, e embora a incidência seja muito baixa (0,4 e 0,8 por 100 000 indivíduos vacinados) a taxa de letalidade é alta, em torno de 64% (BARRETT, 2009; PULENDRAN *et al.*, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015; OMS, 2016).

Shearer e colaboradores (2017), identificaram os padrões de cobertura vacinal nas áreas endêmicas para FA desde o ano de 1970 até 2016. Foi estimado que em torno de 393,7 milhões a 472,9 milhões de indivíduos estão sem vacinação em áreas de risco para a transmissão da doença, mesmo com um aumento progressivo de cobertura vacinal nessas áreas. Ficou evidente também que a taxa de cobertura vacinal na América Latina é maior do que a estimada na África ao longo dos anos analisados, porém nos dois continentes ainda existem áreas com baixa cobertura vacinal. Ainda, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, com o intuito de impedir a transmissão do YFV, a cobertura vacinal em regiões com

circulação viral deve ser superior a 80%, e se não atingir esse patamar a cobertura vacinal deve transitar entre um limite de segurança de 60-80%. Ademais é importante ressaltar que o YFV não pode ser erradicado, mas se os níveis de cobertura vacinal das populações em risco estiverem altos epidemias podem ser evitadas (SHEARER *et al.*, 2017; WHO, 2017).

A Figura 14 representa uma série histórica de 1980 até 2017 com o número de casos mundiais de FA reportados a OMS e as respectivas coberturas vacinais oficial e estimada pela OMS ao longo dos anos (WHO/IVB, 2018). No plano global da OMS para eliminar as epidemias de Febre Amarela entre 2017 e 2026 estão listadas quatro estratégias para ampliar a vacinação em áreas de risco, sendo elas: fortalecer as campanhas de vacinação e consequente cobertura vacinal em crianças, realizar campanhas de vacinação em massa, implementar campanhas de vacinação de atualização, as quais visam identificar onde estão os gaps vacinais em uma população e mitiga-los e manter um estoque sempre disponível de vacinas para responder a possíveis emergências (WHO, 2017).

Casos de Febre Amarela reportados anualmente a nível global e cobertura vacinal, 1980-2017

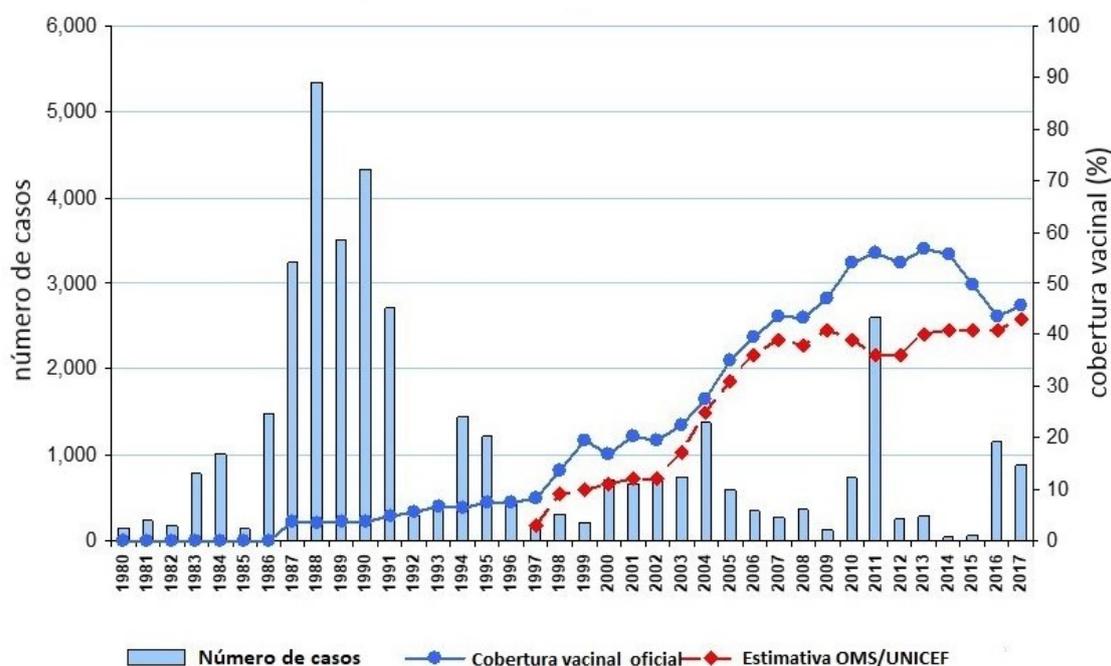


Figura 14: Casos de FA reportados a OMS anualmente e cobertura vacinal contra Febre Amarela no período de 1980 a 2017. Fonte: Base de dados WHO/IVB, 2018.

No Brasil, em decorrência da epidemia recente de Febre Amarela, o Ministério da Saúde alterou as áreas com recomendação de vacinação. Com a expansão das áreas de recomendação o objetivo é proteger a maior parcela possível da população e evitar a expansão da circulação viral. Para o período de monitoramento de 2018/2019 quase todo o território nacional se tornou área de recomendação de vacinação. Sendo excluídos apenas os estados de Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e uma parte do estado do Piauí. Porém, segundo o Ministério da Saúde todo o território nacional deve se tornar área com recomendação de vacinação contra FA ainda no ano de 2019 (Figura 15) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

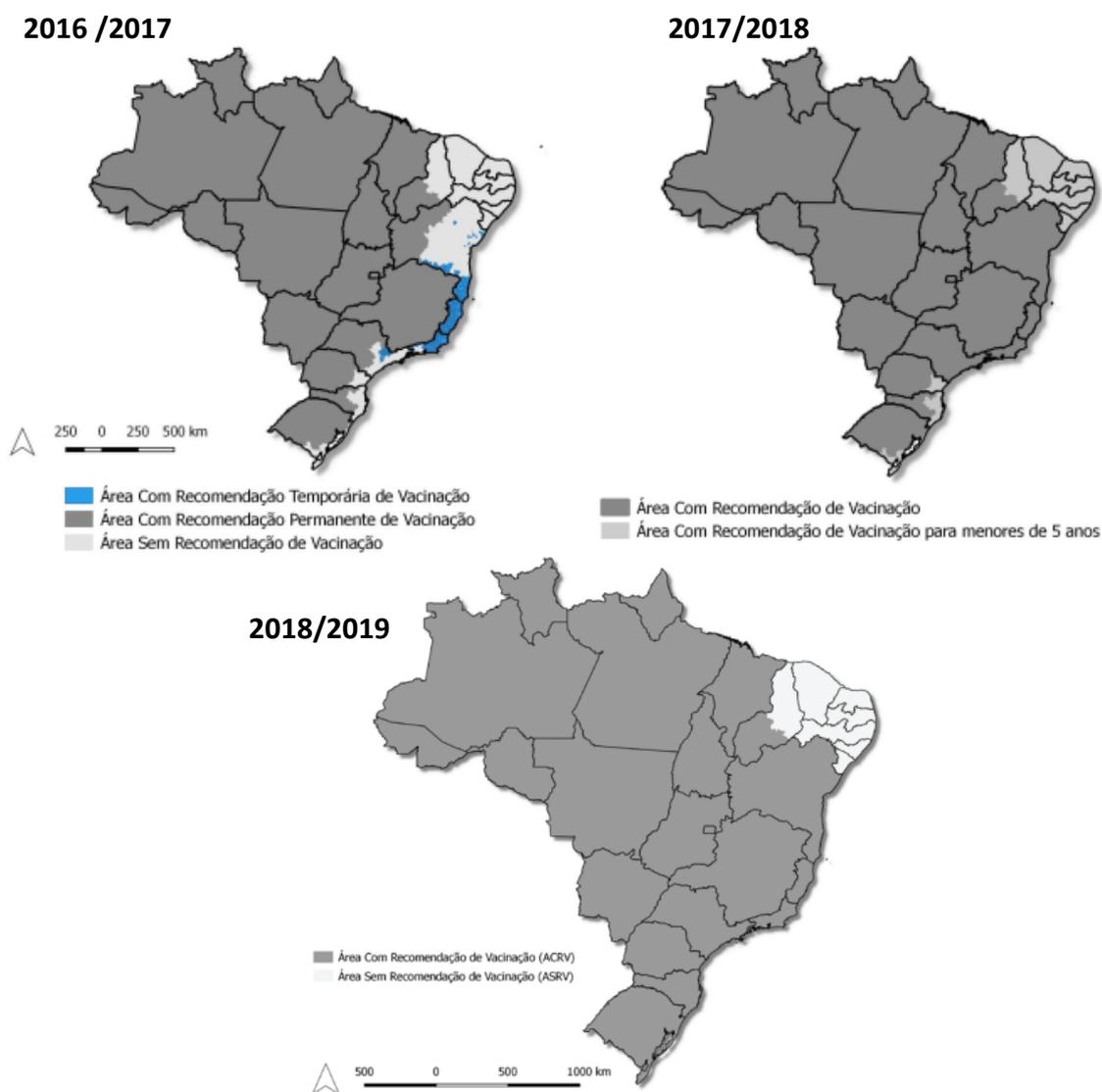


Figura 15: Áreas com recomendação de vacinação contra Febre Amarela, 2016-2019. Destaque para as novas áreas de recomendação de vacinação após o início da epidemia em dezembro de 2016. Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; 2018.

Além de tudo que foi exposto, uma preocupação atual são os estoques vacinais, que em casos de surtos e epidemias não conseguem suprir a demanda, como na epidemia em Angola, em 2015, onde as doses vacinais foram esgotadas por duas vezes (PAULES; FAUCI, 2017; WHO, 2017). Essa situação demonstra como os estoques atuais são insuficientes e como em situações emergenciais os países estão vulneráveis e despreparados para responder eficientemente no controle e prevenção da doença. Todavia, além da vacinação, outras medidas que podem ser adotadas para a prevenção da Febre Amarela são: eliminação dos locais de reprodução dos mosquitos (locais com acúmulo de água parada), uso de repelentes e telas protetoras para evitar picadas dos mosquitos, evitar que os mosquitos urbanos ou silvestres tenham acesso a indivíduos doentes pois esses são fontes de infecção, fortalecer o combate aos vetores em municípios próximos a áreas de transmissão, em caso de surtos eliminar o *Aedes aegypti* com a aplicação de inseticidas nas cidades e realizar campanhas educativas a fim de conscientizar a população sobre as características da doença. Além de medidas como essas, a vigilância eficaz e a rápida detecção de casos são essenciais para o controle dos surtos (MONATH, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015; OMS, 2016; BARRETT, 2017).

1.5.7 Febre Amarela: imunidade humoral e celular

Grande parte do que se conhece acerca da resposta imune relacionada ao YFV se deve aos indivíduos que são vacinados contra a FA, já que poucos são os modelos animais utilizados e devido à dificuldade de obtenção de amostras de indivíduos que foram a óbito pela enfermidade (DOUAM; PLOSS, 2018).

Com relação ao início da resposta imune contra a infecção viral, antes da geração de uma resposta humoral, a imunidade inata por meio das células natural killer (NK), interferons (IFNs) e outras citocinas pró-inflamatórias é responsável por empenhar-se em restringir a replicação viral. Nesse contexto inicialmente as células NK, reconhecem e desencadeiam a lise de células infectadas expondo os antígenos virais, são secretadas citocinas pró-inflamatórias e IFN- α , os quais desempenham função antiviral e posteriormente à ativação de células dendríticas e macrófagos é iniciada a resposta imune adaptativa. Uma resposta inata rápida e robusta auxilia na

montagem de uma resposta adaptativa potente e durável contra o YFV (MARFIN; MONATH, 2008).

Os anticorpos são as principais moléculas efetoras da imunidade humoral, e no que diz respeito a infecções por flavivírus os anticorpos desempenham importante papel na resposta imune do hospedeiro. Para os vírus incluídos nesse gênero, a proteína E do envelope, é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes, os quais são capazes de neutralizar diretamente partículas virais impedindo que estas entrem nas células (DOWD; PIERSON, 2011; HEINZ; STIASNY, 2012; FLINT *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2018).

A medição de anticorpos neutralizantes pode ser considerada um dos melhores parâmetros para identificar respostas protetoras contra a maioria das infecções virais, inclusive para a identificar a imunidade aos flavivírus. Ademais, anticorpos neutralizantes induzidos por vacinação podem ser detectados por décadas (PIERSON *et al.*, 2008; HEINZ; STIASNY, 2012; WATSON; KLIMSTRA, 2017).

A imunidade induzida pela vacina 17D geralmente ocorre no intervalo de 7 a 10 dias, e a vacina apresenta alta taxa de soroconversão. A vacina é capaz de induzir proteção contra todos os 7 genótipos virais de YFV circulantes. A resposta imune originada é rápida e eficiente, e induz tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, sendo capaz de estimular o início rápido de uma resposta humoral específica (BARRETT, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015).

Entre um período de 3 a 7 dias pós vacinação já pode ser detectada a presença de anticorpos IgM, no decorrer de duas semanas, estes atingem níveis máximos e depois entram em declínio, persistindo por aproximadamente 18 meses pós vacinação. Os anticorpos neutralizantes são observados em 6 dias após a vacinação, e alcançam o pico em duas semanas. A resposta de anticorpos neutralizantes IgG é mais lenta, porém as imunoglobulinas G podem persistir por até 40 anos. Durante um período de 4 a 6 semanas, os títulos de anticorpos IgM geralmente se apresentam mais altos do que os de IgG (BARRETT, 2009; PULENDRAN, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; PIERSON; DIAMOND, 2013; WATSON *et al.*, 2016).

Também é observada uma potente resposta com células T antígeno-específicas CD8⁺ e CD4⁺. Estas são detectadas na primeira semana pós vacinação.

Estão presentes linfócitos T CD4⁺ com fenótipos mistos de Th1 / Th2 e linfócitos T citotóxicos CD8⁺, sendo que o pico de resposta de TCD8⁺ é observado geralmente 15 dias após a imunização, retornando aos níveis normais por volta de 30 dias depois. Para os linfócitos TCD4⁺ ocorre a transição para fenótipo de memória decorrido um mês pós vacinação. Estudos demonstram que essas células desempenham importantes papéis na depuração viral, auxiliando as células B e maturação dos anticorpos (Figura 16) (BARRETT, 2009; PULENDRAN, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; PIERSON; DIAMOND, 2013; MONATH; VASCONCELOS, 2015; FERREIRA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018).

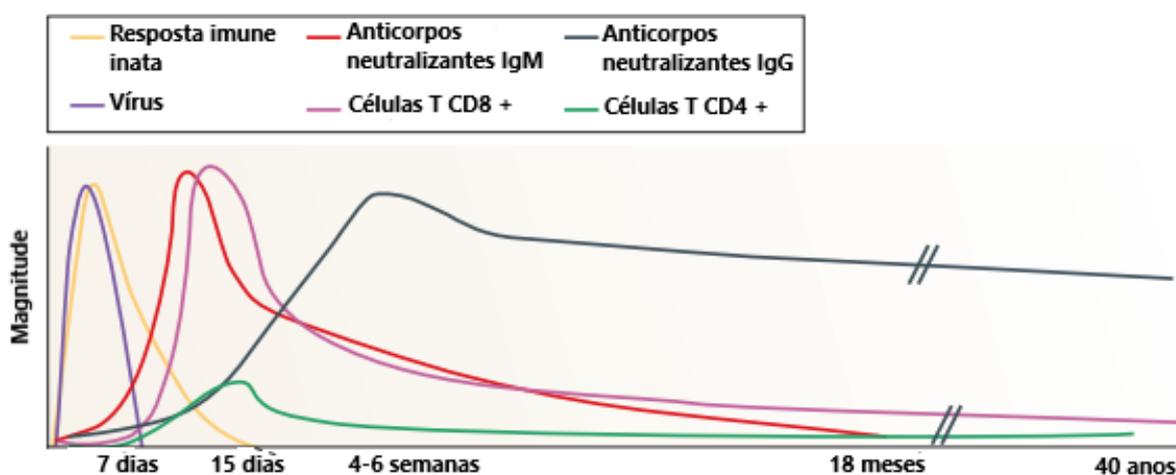


Figura 16: Perfil de resposta imunológica após a vacinação contra Febre Amarela. São ilustradas a magnitude dos principais componentes de resposta imune do hospedeiro e da presença viral em relação ao tempo pós vacinação. Fonte: Adaptado de PULENDRAN, 2009.

Dos indivíduos imunizados com a vacina, estudos imunológicos apontam que em torno de 90% apresentam anticorpos neutralizantes, os quais serão capazes de proteger o indivíduo em uma possível reexposição ao vírus. Porém é válido ressaltar que interações distintas entre patógeno e hospedeiro podem alterar a imunogenicidade da vacina YFV-17D e a patogenicidade do YFV (MARFIN; MONATH, 2008; GOTUZZO *et al.*, 2013; DOUAM; PLOSS, 2018).

Dessa maneira, a vacina 17D reproduz uma infecção viral aguda e a imunidade protetora de longo prazo desencadeada pode ser atribuída a fatores como o equilíbrio correto e integração das respostas inata e adaptativa, e a robusta indução tanto de anticorpos neutralizantes quanto de células T (Figura 17) (FERREIRA *et al.*, 2011; WATSON; KLIMSTRA, 2017; FERREIRA *et al.*, 2018).

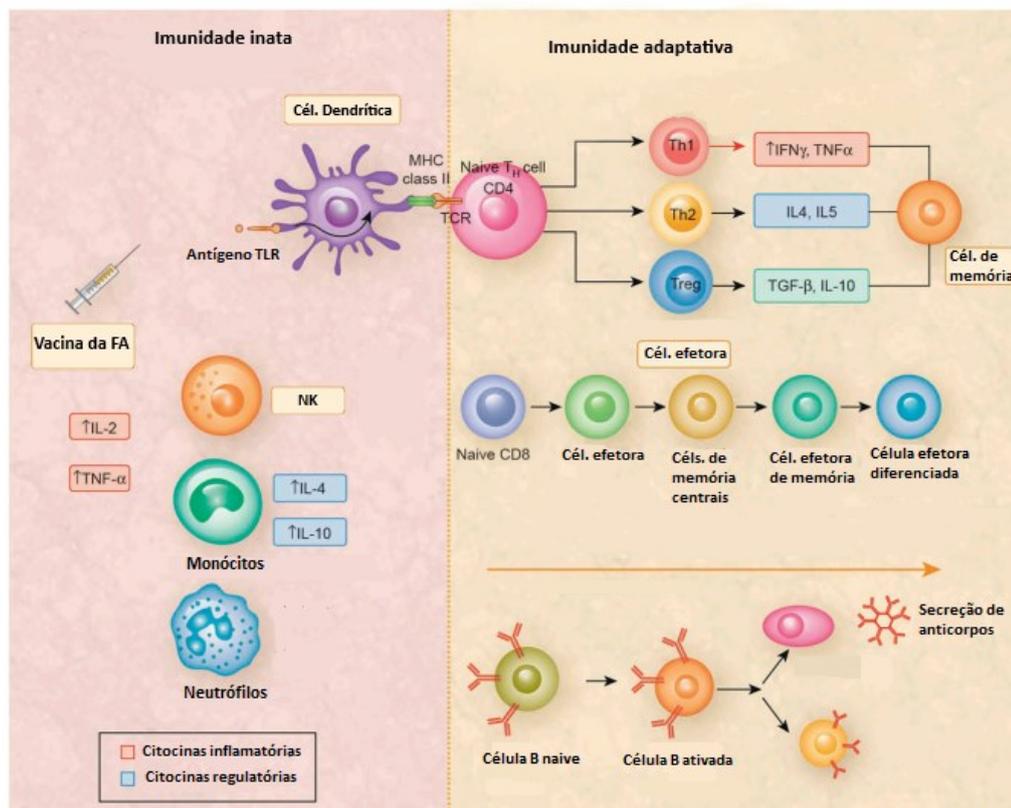


Figura 17: Padrão de resposta imune pós vacinação contra Febre Amarela. A representação mostra um resumo da ativação da resposta imune inata e adaptativa induzida pelas vacinas contra FA. Fonte: FERREIRA *et al.*, 2018.

Buscando compreender e avaliar a soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV em distintas populações, alguns estudos sorológicos recentes merecem destaque. Exemplos são o estudo de Miyaji e colaboradores (2017), que buscou avaliar a prevalência e os títulos de anticorpos neutralizantes contra FA em indivíduos previamente vacinados com idade ≥ 60 anos em relação a jovens adultos e observou que não houve diferença significativa na prevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV entre os dois grupos analisados, mas observou que os títulos foram menores nos idosos; e o estudo de Machado e colaboradores (2013), o qual realizou uma avaliação sorológica contra a FA em 383 indivíduos de uma população rural endêmica em Goiás, e encontrou uma soroprevalência de 97,6% da população analisada apresentando títulos de anticorpos protetores ($> 1:10$) contra a FA.

1.5.8 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico conclusivo dos casos suspeitos de Febre Amarela é importante não só para o manejo do paciente, mas também para a resposta eficaz em situações de surto. Em situações epidêmicas a FA é uma doença de fácil diagnóstico, pois com a presença de casos anteriores as suspeitas são direcionadas, entretanto casos esporádicos e casos considerados leves e moderados são difíceis de diagnosticar. Isso ocorre, pois, nos estágios iniciais da FA muitas manifestações clínicas são semelhantes a outras enfermidades como malária, hepatites virais, leptospirose, septicemias, dengue hemorrágica, além de outras febres hemorrágicas (VASCONCELOS, 2002; MONATH, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROMANOS; CAVALCANTI, 2015; WHO, 2016).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para o diagnóstico laboratorial definitivo da FA sendo que a confirmação da doença pode ser garantida a partir do isolamento viral, da identificação de antígenos virais, da presença do RNA viral, e da detecção de anticorpos específicos contra o vírus. Na fase inicial da infecção, durante os cinco primeiros dias após o início dos sintomas (fase virêmica) é possível identificar o vírus ou o ácido nucléico viral em amostras de soro e tecidos. Nesse período, o isolamento viral em cultura de células (células VERO, células C6/36) pode ser realizado, e a detecção do genoma viral por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR). Recomenda-se ainda, realizar a PCR e o teste sorológico de ELISA IgM para amostras coletadas de 5 a 7 dias após o início dos sintomas, pois o RNA viral já foi detectado também em até 7 dias após o início dos sintomas. A partir do 5º dia do início dos sintomas, fase pós-virêmica, pode se realizar o diagnóstico por sorologia e um resultado IgM positivo é presuntivo de infecção recente pelo YFV, sendo necessário realizar o diagnóstico diferencial em relação a outros flavivírus circulantes no país (VASCONCELOS, 2002; CDC, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; OMS, 2017).

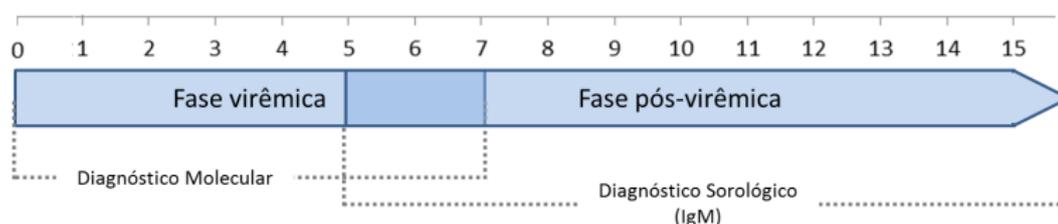


Figura 18: Indicações de diagnóstico para FA de acordo com o dia de início de sintomas. Fonte: OMS, 2017.

Em relação aos métodos sorológicos, a principal técnica realizada é a detecção de anticorpos IgM específicos presentes no soro por meio da técnica de MAC ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), porém devem ser levados em conta a história de vacinação do paciente e dados epidemiológicos. Essas informações são importantes pois anticorpos IgM vacinais podem perdurar por meses após a vacinação. Além disto, a ocorrência de reações cruzadas com outros flavivírus também pode influenciar no diagnóstico. Diante disso, os resultados positivos em que não há histórico de vacinação devem ser confirmados para FA realizando-se um painel de ELISA para outros flavivírus e testes mais específicos como o teste de soroneutralização por redução de placa (PRNT) (Figura 19) (MONATH, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CDC, 2015; WHO, 2016).

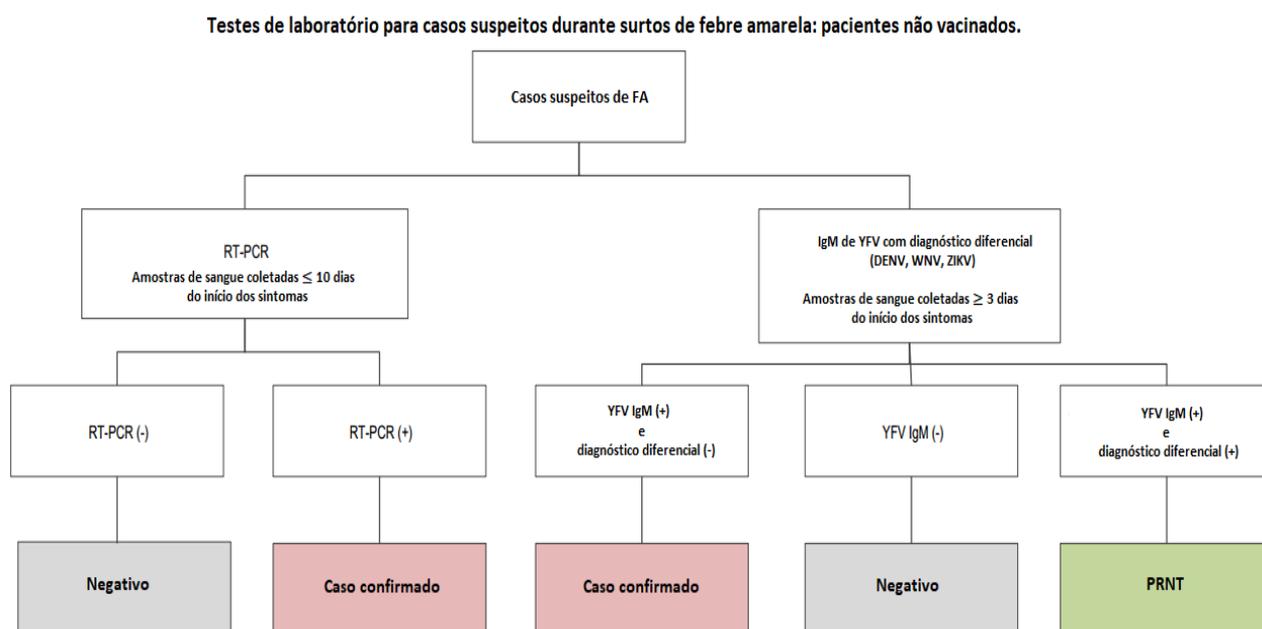


Figura 19: Fluxograma com os principais testes laboratoriais específicos para Febre Amarela. Amostras provenientes de casos suspeitos de FA são submetidas a abordagens de diagnóstico molecular e/ou sorológico, a partir dos testes laboratoriais os resultados são conclusivos ou negativos, porém em alguns casos pode ser necessária a realização de diagnóstico sorológico diferencial. Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

O diagnóstico sorológico de uma infecção por YFV pode ser complexo devido à reatividade cruzada com outros vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, como DENV, WNV, SLEV ZIKV. Diante disso, o teste que garante maior especificidade para a detecção de anticorpos contra YFV é o teste de PRNT, o qual é considerado como o atual “padrão ouro” para o diagnóstico diferencial de flavivírus (DOMINGO et

al., 2018). O teste de PRNT é um método sorológico utilizado para detectar e quantificar anticorpos neutralizantes específicos para um determinado vírus em amostras de soro. Na técnica, descrita pela primeira vez na década de 1960, são utilizados os soros testes, partículas virais e culturas celulares. Quando o anticorpo neutralizante se liga ao vírus há a formação de complexos vírus-anticorpo e a infecção viral é inibida nas células susceptíveis (WHO, 2007; JONKER *et al.*, 2013; MAEDA; MAEDA, 2013; KROON *et al.*, 2016).

Em regiões com co-circulação de flavivírus, é recomendada a utilização do teste de PRNT₉₀ de maior rigor, onde a técnica irá garantir mais especificidade do que outras técnicas sorológicas. Porém em situações de surto, a utilização de PRNT não é viável devido ao custo e ao elevado tempo para obtenção do resultado (OMS, 2017; DOMINGO *et al.*, 2018).

Além do que foi exposto, pode ser realizada também a coloração imuno-histoquímica de amostras de tecidos fixos em formalina (destaque para o fígado) para detecção de antígeno viral. No exame histopatológico do fígado é possível destacar a presença de lesões características da FA no tecido hepático, como a necrose médio-lobular ou médio-zonal e a presença dos corpúsculos acidófilos de Coucilman (MONATH, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CDC, 2015).

Alguns exames inespecíficos podem complementar o diagnóstico, como o hemograma e exame de urina que fornecem informações sobre as funções hepática e renal. Esses, podem auxiliar no acompanhamento do quadro clínico do paciente e no manejo ao longo da evolução da doença. Em casos de FA deve-se atentar para resultados elevados com relação a bilirrubina no sangue, as aminotransferases, e valores de ureia e creatinina, podendo ser observada ainda plaquetopenia e alteração nos fatores de coagulação. No exame de urina é comum a presença de proteinúria (VASCONCELOS, 2002; BRITO *et al.*, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Ainda com relação a urina, um estudo recente identificou a presença do YFV em amostras de urina e de sêmen de um paciente que sobreviveu a doença. O genoma completo do vírus isolado a partir da urina foi sequenciado e se agrupou ao genótipo Sul-Americano I. A detecção do vírus na urina e sêmen sugere que esses dois fluidos corporais podem ser amostras clínicas importantes para o diagnóstico de Febre Amarela (BARBOSA *et al.*, 2018). A fim de se efetivar o diagnóstico da melhor forma possível, deve ser levada em conta a especificidade de cada caso,

englobando características clínicas do paciente, contexto epidemiológico em que está inserido, histórico de vacinação e histórico de viagens, além de atividades desenvolvidas pelo indivíduo (CDC, 2015; WHO, 2016).

No Brasil, os exames para diagnóstico de infecção por YFV, são realizados em laboratórios de referência em diversos estados, o laboratório de referência nacional para diagnóstico laboratorial da FA é o Instituto Evandro Chagas, situado no Pará. Os métodos diagnósticos utilizados no país são baseados também em sorologia, biologia molecular (RT-PCR), isolamento viral, histopatologia e imuno-histoquímica. Em Minas Gerais, o diagnóstico laboratorial é realizado no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, Instituto Octávio Magalhães/Fundação Ezequiel Dias (IOM/FUNED), sendo realizada sorologia pelo método de MAC ELISA e o isolamento viral. As amostras que devem ser submetidas a RT-PCR e análise Histopatológico/Imuno-histoquímica são encaminhadas pelo IOM/FUNED à FIOCRUZ/RJ, Laboratório de Referência Regional para Febre Amarela (BRASIL, 2018; SES/MG, 2018).

Não existe um antiviral específico para o tratamento da FA, deste modo o tratamento é somente sintomático, visando controlar os sintomas e reduzir as possíveis complicações. O paciente com suspeita de FA deve iniciar o tratamento de suporte imediatamente, e são recomendados o repouso e a reposição de líquidos. A grande maioria dos casos tem resolução rápida, mas pacientes que apresentarem quadros mais graves devem ser hospitalizados para receber todo o suporte e atenção intensiva. A terapia de suporte visa diminuir o risco de óbitos e deve incluir a manutenção nutricional e prevenção de hipoglicemia, substituição de fluidos, administração de oxigênio, tratamento de hemorragias, diálise na presença de insuficiência renal, além da administração de antibióticos para tratar infecções secundárias. São usados medicamentos como analgésicos e antitérmicos, para controlar sintomas como febre e dor. Podem ser administrados também fármacos como cimetidina e ranitidina, que protegem a mucosa gástrica e auxiliam na prevenção de sangramentos gástricos. É considerável destacar que medicamentos contendo ácido acetilsalicílico são contraindicados, pois esse componente pode agravar ou facilitar quadros de hemorragia (MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CDC, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A Febre amarela é uma doença viral que apresenta um grande impacto para a saúde pública no Brasil. O YFV infecta humanos e primatas não humanos, podendo ocasionar epidemias graves com potencial de causar doença hemorrágica fatal. A Organização Mundial da Saúde estima que nas regiões endêmicas para FA 200.000 pessoas são afetadas todos os anos mesmo com a disponibilidade de uma vacina.

Além disso, outro agravante para a infecção causada pelo YFV é o fato de não existir um tratamento antiviral específico para a doença, e assim a terapia é voltada somente para o controle dos sintomas. São observadas altas taxas de letalidade em infecções graves e o YFV pode ser considerado como um dos arbovírus mais graves a circular nas Américas, sendo que a FA é uma ameaça potencial que pode ultrapassar fronteiras e deve ser monitorada. Mesmo com os esforços de vacinação e eliminação de vetores, a FA não pode ser erradicada, pois apresenta caráter enzoótico e os ciclos de transmissão silvestre são mantidos nas áreas tropicais endêmicas.

O Brasil vivenciou uma grande epidemia recente que se iniciou em dezembro de 2016 e se estendeu até 2018, e diante do panorama atual as autoridades de saúde se encontram em alerta. Com a confirmação de um elevado número de casos humanos, sendo 2.155 confirmados, além de inúmeras epizootias em PNH, as principais preocupações atuais são com relação a vacinação da maior parcela possível da população e com a possível ocorrência de Febre Amarela urbana. O risco da reinstalação e manutenção do ciclo urbano da doença no Brasil é considerável, devido à presença do vetor *A. aegypti* nas áreas mais populosas do país. A reurbanização da FA poderia ser catastrófica e atingir uma grande parcela de indivíduos não vacinados, ocasionando em um número significativo de casos e óbitos, além do perigo de expansão da doença para outras populações susceptíveis.

Com essa reemergência de casos no país a FA demonstrou novamente a sua importância e a necessidade de ser monitorada, com ações conjuntas de vigilância epidemiológica tanto das populações humanas quanto de primatas não humanos. Essa epidemia acarretou a revisitação de vários conceitos sobre a FA e sua epidemiologia, e nesse contexto a vigilância é imprescindível para a detecção rápida de casos e para antecipar o risco de transmissão da doença entre humanos.

Nesse último surto, grande parte dos casos humanos de FA confirmados ocorreu em Minas Gerais, estado considerado como área de recomendação permanente de vacinação contra a doença. Dessa forma, a região de Diamantina e o município do Serro, os quais são os locais alvo deste estudo, são considerados como locais de risco para transmissão da doença. Diante desse panorama, avaliar a soroprevalência de anticorpos neutralizantes contra a FA nos indivíduos das populações residentes nesses locais é importante para alertar para a existência de indivíduos susceptíveis na população. Os dados acerca da distribuição de anticorpos neutralizantes entre as diferentes faixas etárias das populações analisadas, assim como o sexo, local de residência, fatores de risco aos quais se encontram expostas e status vacinal declarados fornecerão um conhecimento importante que poderá contribuir com a saúde pública do município e assim destacar a possível necessidade de mais campanhas de vacinação contra a FA, ou até mesmo variações nas estratégias das campanhas evitando possíveis novos casos e até o princípio de um ciclo urbano na região.

Além disso, os resultados encontrados neste estudo também poderão contribuir para uma visão mais abrangente sobre a soroconversão em indivíduos que residem em áreas de risco e como essa soroconversão reflete a cobertura vacinal declarada nestas regiões.

3. OBJETIVOS

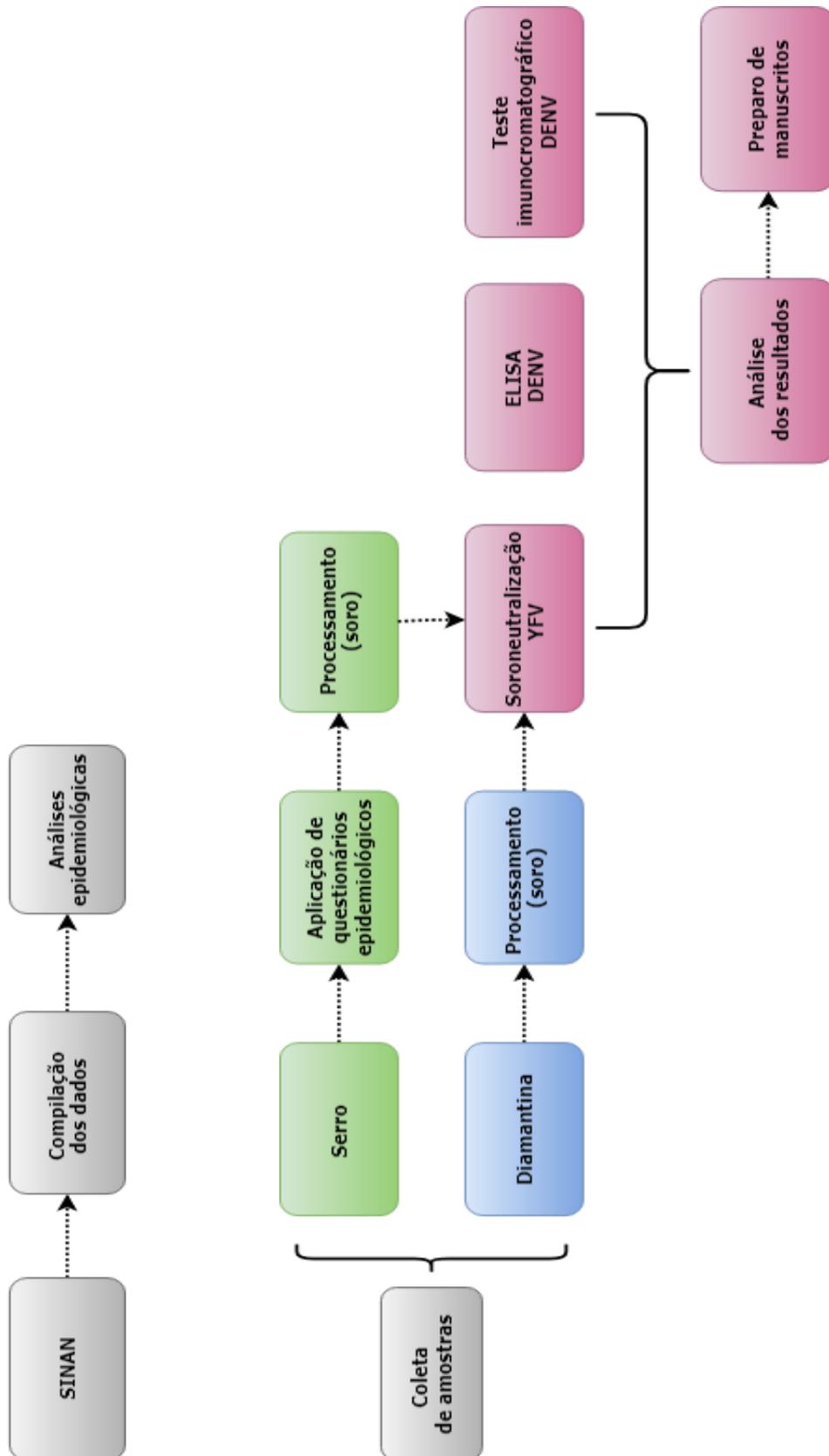
3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil sorológico contra o vírus da Febre Amarela em uma população rural e urbana de uma área de risco para Febre Amarela, no estado de Minas Gerais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises epidemiológicas para Febre Amarela a partir de dados secundários do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), buscando identificar possíveis áreas de risco para a transmissão da doença em Minas Gerais;
- Avaliar a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV em amostras de soro de moradores das áreas urbana e rural do município do Serro, e de pacientes com suspeita clínica de infecção por arbovírus da Superintendência Regional de Saúde do município de Diamantina;
- Comparar os resultados da soroneutralização com base em dois cut-offs, PRNT₅₀ e PRNT₉₀;
- Detectar a presença de anticorpos IgG e IgM anti-DENV (DENV-1, 2, 3 e 4) nas amostras de soro analisadas por meio de teste rápido imunocromatográfico;
- Avaliar a presença de anticorpos IgG anti-DENV-1 nos soros coletados, por meio da técnica de *Enzyme Linked Immuno sorbent Assay* (ELISA).

4. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



5. METODOLOGIA

5.1 Análises epidemiológicas com base em dados do SINAN

Com o objetivo de realizar análises epidemiológicas relacionadas à ocorrência Febre Amarela no Brasil e em Minas Gerais foi utilizada a plataforma do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) do Ministério da Saúde. Essa base de dados é fomentada pela notificação de casos de doenças e agravos que estão incluídos na lista nacional de doenças de notificação compulsória, sendo reportadas também doenças específicas de cada região do país, contemplando dados desde o ano de 2001 até o ano de 2016. Por meio dessa ferramenta é possível analisar dados como: a distribuição espacial e temporal dos casos humanos, a faixa etária predominante e sexo. A partir dessa análise foi possível correlacionar esses dados com possível ocupação dos hospedeiros humanos e a fatores ambientais (clima, precipitação), aos biomas de cada região e a presença de áreas degradadas. Essa análise contribui para identificar a realidade epidemiológica da Febre Amarela no Brasil, bem como fornece subsídios para melhor compreensão da ecologia do vírus da Febre Amarela, sua circulação, dispersão pelo país e recente ocorrência de surtos.

Para isso a plataforma foi acessada em um domínio público, através do DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde), onde estão armazenadas informações epidemiológicas e de morbidade para as Doenças e Agravos de Notificação do país. A partir daí os dados de casos de Febre Amarela confirmados e notificados no SINAN foram selecionados no período disponível na base (2001 a 2016) e filtrados de acordo com a variável desejada. Os dados encontrados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel e após a montagem de um banco de dados estes foram analisados. A última atualização da base de dados ocorreu em 04 de maio de 2018, sendo que dados referentes aos anos de 2017 e 2018 não foram incluídos na plataforma.

Em decorrência da epidemia de FA silvestre que teve início em dezembro de 2016, foi realizada uma requisição junto ao Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde /MS dados atualizados em 19.04.18) para a obtenção de dados anuais sobre o número de casos de FA confirmados também nos anos de 2017 e parte do ano de 2018

5.2 Áreas de estudo

O estudo populacional foi realizado em uma amostra aleatória de indivíduos residentes nas áreas urbana e rural do município do Serro, pertencente ao estado de Minas Gerais (Figura 20). Segundo dados do IBGE, o Serro possui uma população de 21.431 habitantes, sendo 11.060 residentes em área urbana (IBGE, 2016). Além disso, para esse estudo, também foram analisadas amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arbovirose provenientes da Superintendência Regional de Saúde do município de Diamantina, o qual possui uma população de 48.095 habitantes, e dista aproximadamente 90km do Serro (IBGE, 2016). De acordo com o Ministério da Saúde (2017), os municípios encontram-se na área com recomendação permanente de vacinação contra a Febre Amarela.

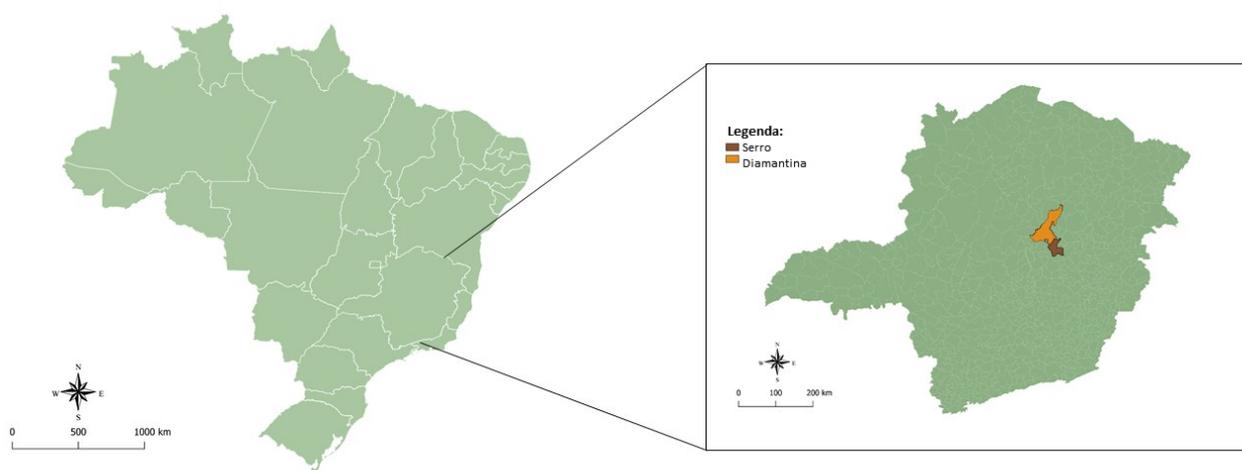


Figura 20: Mapas evidenciando a localização geográfica das áreas de estudo no estado de Minas Gerais. Em marrom está destacado o município do Serro ($18^{\circ} 36' 17''$ S $43^{\circ} 22' 46''$ W) e em laranja o município de Diamantina ($18^{\circ} 14' 56''$ S, $43^{\circ} 36' 0''$ W). Fonte: Mapa gerado pelo autor (Software QGIS) a partir de dados do IBGE.

5.3 Amostras

Nesse estudo foram avaliadas amostras que fazem parte da coleção do grupo de Ecologia de Vírus Emergentes (ECOVIR), coletadas na região rural no município do Serro, nos anos de 2012 e 2013; e amostras referentes a área urbana que foram coletadas em 2015 e durante o desenvolvimento desse trabalho, nos

anos de 2017 e 2018. Também foram incluídas amostras de casos suspeitos de arboviroses, cedidas pelo Professor Danilo Bretas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri (UFVJM), em Diamantina, no ano de 2017.

Assim, amostras de sangue (5 mL) foram coletadas para obtenção do soro, utilizando o sistema a vácuo (Vacutainer®), após o consentimento livre e esclarecido dos participantes. Essas amostras foram estocadas a -20°C e transportadas até o Laboratório de Vírus, ICB/UFMG onde foram processadas e analisadas. As amostras de Diamantina foram coletadas em 2017 e possuem dados demográficos dos pacientes. O total de amostras de soro analisadas nesse estudo corresponde a 632, sendo 218 correspondentes a área rural e 363 a área urbana do município do Serro, além de 51 amostras correspondentes ao grupo de pacientes da Superintendência Regional de Saúde de Diamantina (SRS). Segundo a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, a SRS de Diamantina compreende 34 municípios, dentre eles amostras incluídas nesse projeto são correspondentes aos municípios de Diamantina, Carbonita, Gouveia, Minas Novas, Senador Modestino Gonçalves e Turmalina.

5.4 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi estimado com base no estudo conduzido por Machado e colaboradores (2013), com modificações. Portanto, o cálculo amostral para coleta em área urbana foi realizado utilizando-se uma prevalência esperada de 50%, erro alfa de 5%, precisão de 10% em torno da estimativa e efeito de desenho de 1.0 de acordo com uma população urbana de 11.060 habitantes (IBGE, 2016). Utilizando o Programa Open-Epi, determinou-se uma amostra mínima de 372 indivíduos para a realização do estudo na população urbana do Serro.

Em relação à população rural, trata-se de uma investigação retrospectiva, utilizando-se uma amostra representativa da população rural do Serro. Durante 2012–2013, Costa e colaboradores (2016) realizaram um estudo para estimar a soroprevalência para *Orthopoxvirus* na região. O tamanho amostral foi definido com uma abordagem semelhante ao estudo conduzido por Machado (MACHADO *et al.*, 2013). Naquela ocasião, foi determinada uma amostra mínima de 210 indivíduos para a população rural do Serro, considerando a possibilidade de perdas, recusas e exclusão (COSTA *et al.*, 2016).

5.5 Seleção dos Participantes

A seleção de todos os participantes incluídos nesse estudo foi realizada em uma parcela aleatória de indivíduos, tanto para a população rural como urbana. Durante as coletas dos anos de 2015, 2017 e 2018 foram percorridos bairros referentes à área urbana do município. Nos bairros e nas propriedades onde o responsável concordou com a realização da pesquisa, indivíduos de todas as faixas etárias foram contatados e aqueles que aceitaram participar, responderam a uma entrevista e foi coletada uma amostra de sangue. Vale destacar que para as amostras referentes a área rural do município coletadas entre setembro de 2012 a março de 2013 e que, portanto, já faziam parte da coleção do grupo ECOVIR, foi assegurada a participação de indivíduos de pequenas, médias e grandes propriedades e de todas as faixas etárias. A localização de todas as propriedades rurais amostradas é conhecida (COSTA *et al.*, 2016).

5.6 Considerações Éticas

A participação no estudo foi voluntária e a todos os indivíduos foi apresentado um termo de consentimento com informações sobre o estudo, seus objetivos, procedimentos e riscos envolvidos. Após aceitar participar do estudo, cada voluntário assinava o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) juntamente com uma testemunha. O documento assinado permaneceu em poder da equipe de pesquisadores envolvida no projeto, enquanto uma cópia foi entregue ao voluntário. Caso o participante não soubesse assinar, o termo de consentimento poderia ser assinado por algum familiar ou a impressão digital era coletada. Todas as coletas realizadas neste trabalho tiveram aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), sendo FR – 413704 o número de registro para área rural e para área urbana o número de parecer 1.974.249, com registro CAAE - 65332216.9.0000.5149. As amostras de Diamantina, também tiveram aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, com número de parecer 1.431.969.

5.7 Instrumentos para Coleta de Informações

Foram utilizados questionários semiestruturados, pré-codificados, contendo perguntas sobre cada um dos participantes (Anexo1). Tanto para as populações urbana e rural foram coletados dados demográficos de todos os voluntários, como sexo, idade, etnia, ocupação, renda e escolaridade. Para as coletas realizadas na área urbana durante os anos de 2017 e 2018 foram adicionadas perguntas aos questionários sobre aspectos relacionadas à Febre Amarela. Já que as coleções de 2012, 2013 e 2015 foram obtidas no contexto de investigação de outra zoonose, algumas questões importantes para o contexto de investigação da Febre Amarela estavam ausentes nos questionários destes referidos anos. Os questionários foram destinados exclusivamente aos projetos de pesquisa de Febre Amarela e Vaccinia Bovina, projetos desenvolvidos pelo grupo de Ecologia de Vírus Emergentes, e como tal não foram disponibilizados para nenhum outro fim. Dados gerados na pesquisa e eventualmente publicados irão preservar a identidade dos voluntários. Ao final do projeto, um relatório com os resultados gerais do estudo será disponibilizado para todos os órgãos ligados à saúde do município. A partir dos dados coletados foram estruturados bancos de dados no Microsoft Excel para posterior realização das análises estatísticas.

5.8 Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa OpenEpi (Estatísticas Epidemiológicas de Código Aberto para a Saúde Pública) versão 3.01. Foram realizadas análises descritivas de todos os dados coletados. Além de análise univariada com comparação das frequências de cada variável nos diferentes grupos, utilizando o teste de qui-quadrado, teste exato de Fisher e cálculo da odds relativa bruta e intervalo de confiança de 95%.

5.9 Metodologia Laboratorial

5.9.1 Células

Células VERO foram utilizadas nos testes de soroneutralização. Células de linhagem contínua VERO são células derivadas de epitélio do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiopsis*) e foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, EUA. As células foram cultivadas em meio de cultura simples (meio mínimo de Eagle – MEM) (Gibco, USA), com acréscimo de soro fetal bovino (SFB) a 5% (Cultilab, Brasil) para o crescimento celular, também foram adicionados antimicrobianos (penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 0,1 mg/mL) e Anfotericina B (2 ug/mL) para inibir o crescimento de bactérias e fungos, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafas de células com áreas de 25cm², 75cm² e 150cm², sendo que para a realização da técnica de soroneutralização, as células foram transferidas para placas de 6 poços com fundo chato, contendo 3x10⁵ células/poço.

5.9.2 Vírus

Para os testes de soroneutralização foi utilizado o vírus vacinal da Febre Amarela, YFV 17DD, lote: 980FPO662. A amostra faz parte da coleção de vírus do Laboratório de Vírus, ICB, UFMG.

5.9.3 Produção de Vírus

Para esse projeto foi realizada a produção de um estoque do vírus da Febre Amarela (YFV) a partir da amostra vacinal 17D. Para isso 1 mL da amostra vacinal foi adicionado a 5 mL de meio MEM e posteriormente esse volume foi inoculado em uma garrafa de cultivo de 150 cm² (TPP®) contendo aproximadamente 1,5x10⁷ células VERO. A adsorção foi feita pelo período de uma hora e trinta minutos, sendo realizada a homogeneização a cada 15 minutos. Ao final da adsorção, o volume da garrafa foi completado para 20 mL com MEM 1% de SFB. Após um período de incubação de 4 dias em estufa a 37°C suplementada com 5% de CO₂, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado à 2500rpm por 15 minutos. Esse sobrenadante foi alíquotado e o pool-semente armazenado em freezer -70°C e posteriormente titulado.

Para a produção de um pool-trabalho 5 garrafas de cultivo de 150 cm² (TPP®) foram infectadas com o pool-semente produzido, na M.O.I de 0,1, seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

5.9.4 Titulação

Para a determinação dos títulos virais do pool-semente e do pool-trabalho de YFV foram preparadas placas de 6 poços com $3,5 \times 10^5$ células VERO/poço, no dia anterior à infecção viral. A partir da amostra viral, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} , sendo que o experimento foi realizado em triplicata.

As diluições foram realizadas em microtubos de 1,5mL sendo adicionado 900µL de Meio MEM 0% de SFB, com antibióticos em cada tubo. No tubo referente à primeira diluição de (10^{-1}) foi adicionado 100µL da amostra viral. Após a homogeneização foi retirado 100 µL deste primeiro microtubo e dos seguintes, até a diluição final de 10^{-6} . No controle de células foi acrescentado apenas meio MEM.

As placas foram incubadas durante duas horas na estufa a 37°C, com 5% de CO₂ para a adsorção, e no decorrer deste período, essas foram homogeneizadas a cada 15 minutos. Após este tempo, 2 mL de meio semissólido (Carboximetilcelulose (CMC) 1%, Meio 199 2X, 2% SFB) foi adicionado em cada poço. As placas foram mantidas em estufa por 5 dias.

Após este período, as células foram fixadas com solução 3,7% de formaldeído, as placas foram lavadas 2 vezes com água e coradas com a solução de cristal violeta 1%. O título viral foi determinado a partir da contagem do número de unidades formadoras de placa (PFU), observadas na monocamada celular, e o cálculo do título foi o número de PFU multiplicado pelo inverso da diluição, dividido pelo fator de correção do volume.

5.9.5 Ensaio de Soroneutralização (Plaque Reduction Neutralization Test – PRNT)

As amostras de soro foram submetidas ao ensaio de soroneutralização. Esse teste foi padronizado segundo protocolos de Maeda e Maeda (2013), WHO (2007) e Kroon e colaboradores (2016) com adaptações. Os soros foram triados na diluição de 1:20. Essa diluição foi realizada em meio MEM sem adição de SFB e adicionado de igual volume de MEM contendo aproximadamente 150 unidades formadoras de

placa (PFU) do YFV 17D. Antes da diluição, as proteínas do sistema do complemento foram desnaturadas através da incubação do soro em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Para o controle de vírus, fundamental para a revelação da técnica, o mesmo processo foi adotado exceto pelo soro diluído, o qual foi substituído por SFB. As soluções de soro e vírus foram homogeneizadas e incubadas por aproximadamente 1 hora a 37°C em atmosfera suplementada com 5% CO₂. Essas soluções foram então inoculadas em placas de seis poços com monocamadas de células VERO com aproximadamente 80% de confluência para adsorção. Durante esse processo, as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e homogeneizadas a cada quinze minutos durante uma hora. Decorrida a adsorção, o meio semissólido (CMC 1%, Meio 199 2X, 2% SFB) foi adicionado a cada um dos poços com um volume suficiente para que as placas ficassem por 5 dias em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Decorridos os 5 dias de incubação, as placas foram fixadas com solução de formaldeído a 3,7% e coradas com solução de cristal violeta a 1% por 1 hora. As placas de lise viral foram visualizadas e contadas. A partir da média do número de placas de cada duplicata, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram média de redução $\geq 50\%$ quando comparadas a quantidade de placas de lise encontradas no controle de vírus. Ainda, para título de comparação, foram avaliados dois pontos de corte para o ensaio, cada amostra foi avaliada quanto a positividade levando em conta os cut-offs de $\geq 50\%$ e $\geq 90\%$.

5.9.6 Teste imunocromatográfico

As amostras de soro foram triadas por meio de teste rápido imunocromatográfico para detectar a presença de anticorpos IgG e IgM anti-dengue (DENV-1, 2, 3 e 4). O teste utilizado foi o Dengue IgG/IgM Eco teste – TR.0061C, da fabricante Eco Diagnóstica. Inicialmente as amostras eram colocadas em temperatura ambiente, e após serem descongeladas eram homogeneizadas antes da realização do teste. Os dispositivos de teste do kit eram colocados na superfície limpa e plana do fluxo laminar. Os dispositivos eram rotulados com o número de identificação da amostra, a quantidade de 5µL de cada amostra era então adicionada à cavidade da amostra no cassete do teste. Posteriormente eram adicionadas 3 gotas (aproximadamente 110-130µL) do tampão diluente no local de

aplicação do diluente. Após a adição do diluente era cronometrado o tempo de 25 minutos, período recomendado pelo fabricante, para a leitura do resultado. Para controlar a qualidade do teste, deveria sempre se observar a presença do controle interno (linha C), caso ela não estivesse presente o teste deveria ser repetido em um novo dispositivo cassete.

5.9.7 Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA)

Em cada poço da placa de ELISA MaxiSorp (Nunc, Dinamarca) foi adicionado o antígeno DENV (50ng/poço), diluído em tampão-bicarbonato de (0,05M, pH 9,6). As placas foram mantidas a 8°C por 18 horas. O líquido foi então desprezado e as placas lavadas utilizando solução de salina tamponada (pH 7,0) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), por 3 vezes. Para o bloqueio foi utilizado 1% BSA, diluído em solução de lavagem. Foram adicionados 300µL de solução de bloqueio em cada poço e deixados por 2 horas à 37°C. O líquido foi então descartado e as placas foram lavadas três vezes. Após lavagem foi adicionado 100µL por poço e em duplicata, dos soros controles e soros testados diluídos nas proporções de 1:100 em solução de diluente. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas por três vezes. Em seguida, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (SIGMA, EUA) diluído em solução diluente por 1 hora à 37°C. As placas foram lavadas por três vezes e 100µL do substrato TMB foi adicionado. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a reação foi interrompida pela adição de 40 µL/câmara de ácido sulfúrico a 2N, e a leitura realizada em espectrofotômetro de microplacas CELER, com filtro de 450/630nm onde os resultados foram expressos em absorbância.

6. RESULTADOS

6.1 Análises epidemiológicas do SINAN

A fim de compreender a realidade epidemiológica da Febre Amarela e a circulação viral no Brasil, e principalmente no estado de Minas Gerais, foram tabulados dados epidemiológicos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Após a pesquisa na base de dados, análise e tabulação dos dados disponíveis, foram gerados gráficos para cada categoria analisada.

Considerando os dados relativos ao número de casos confirmados de FA notificados no SINAN, os anos que apresentaram maior número de casos no período foram 2003 (n=52), 2016 (n=52) e 2009 (n=47). Os dados referentes aos casos confirmados nos anos de 2017 e 2018 são provenientes da requisição realizada ao Ministério da Saúde (SVS/MS) com dados atualizados até a data de 19 de abril de 2018 (Figura 21).

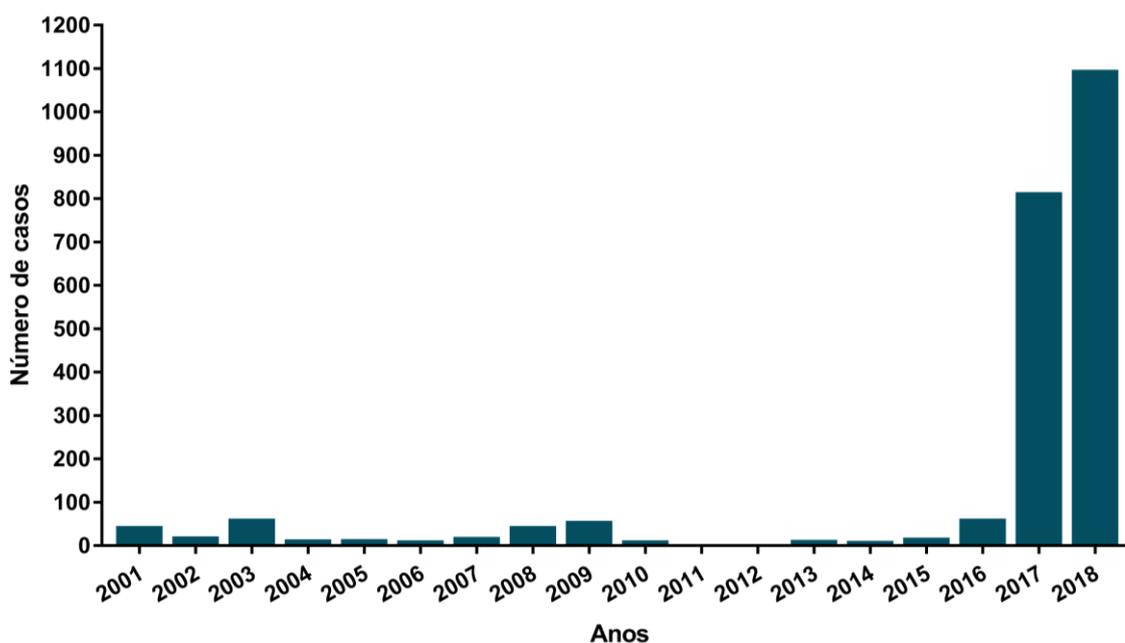


Figura 21: Distribuição de casos de Febre Amarela por ano no Brasil. Representação gráfica dos dados referentes aos casos confirmados de Febre Amarela no período de 2001 a 2018.

Em relação ao número de casos confirmados por unidade da federação na base de dados do SINAN, nota-se que ao longo do período observado o estado de Minas Gerais evidenciou o maior número de casos (n=128), sendo seguido por São Paulo (n=45) também localizado na região sudeste do país, além de números de casos significativos observados também nos estados de Rio Grande do Sul (n=20), Goiás (n=19) e Amazonas (n=16) (Figura 22).

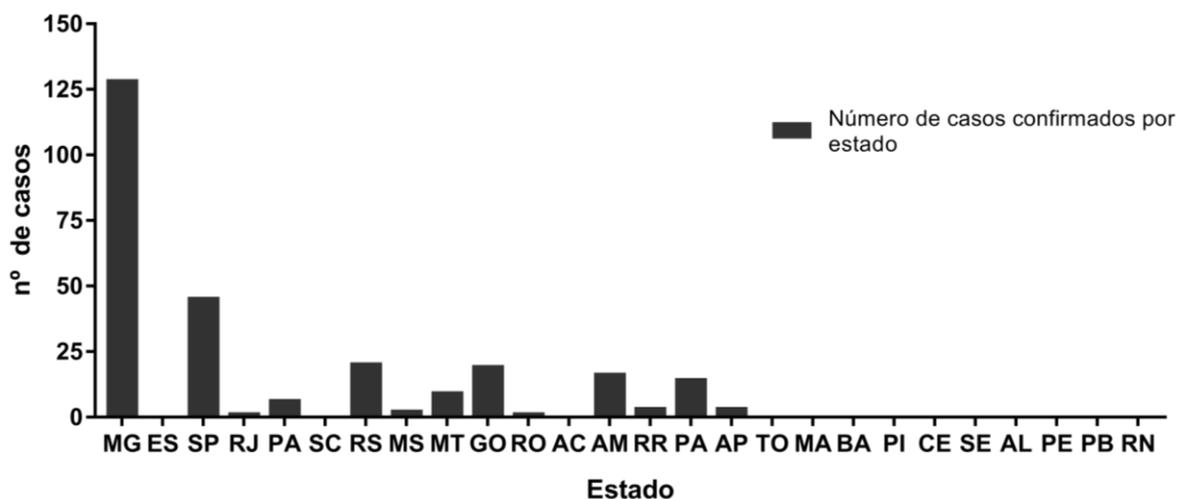


Figura 22: Distribuição de casos de Febre Amarela por estados no Brasil. Representação gráfica dos dados referentes ao número de casos de FA confirmados por estados, no período de 2001 a 2016.

Também foram analisados os dados do SINAN referentes ao número de casos de FA por sexo durante o período de 2001 a 2016. De todos os casos notificados a maioria foi do sexo masculino, 84,17%, enquanto apenas 15,83% foram do sexo feminino (Figura 23).

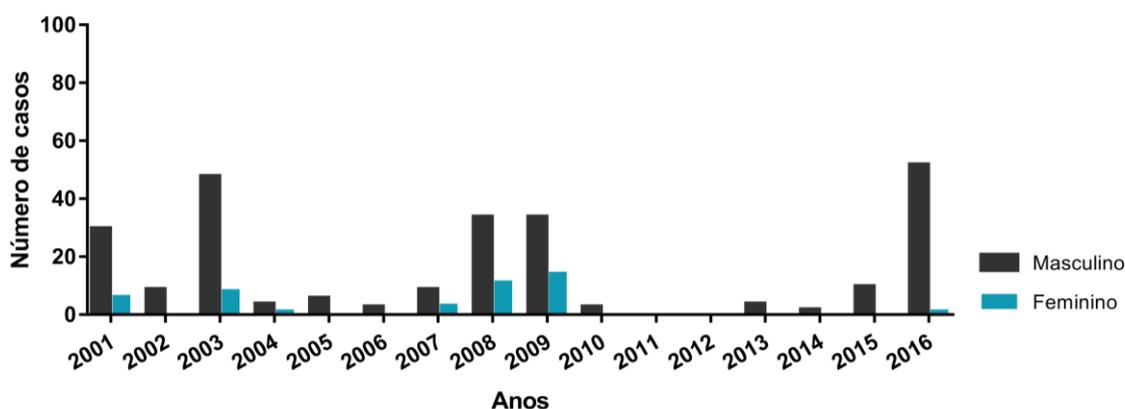


Figura 23: Distribuição de casos de Febre Amarela por sexo no período de 2001 a 2016. Representação gráfica do número de casos de FA distribuídos por sexo. Masculino: cinza; Feminino: azul.

Com o propósito de compreender acerca do curso clínico da infecção dos casos de FA, os dados analisados a partir do SINAN revelaram que 50,72% dos casos confirmados foram a óbito, 44,96% alcançaram a cura e 4,32% dos casos não tinham dados referentes ao desfecho clínico (Figura 24).

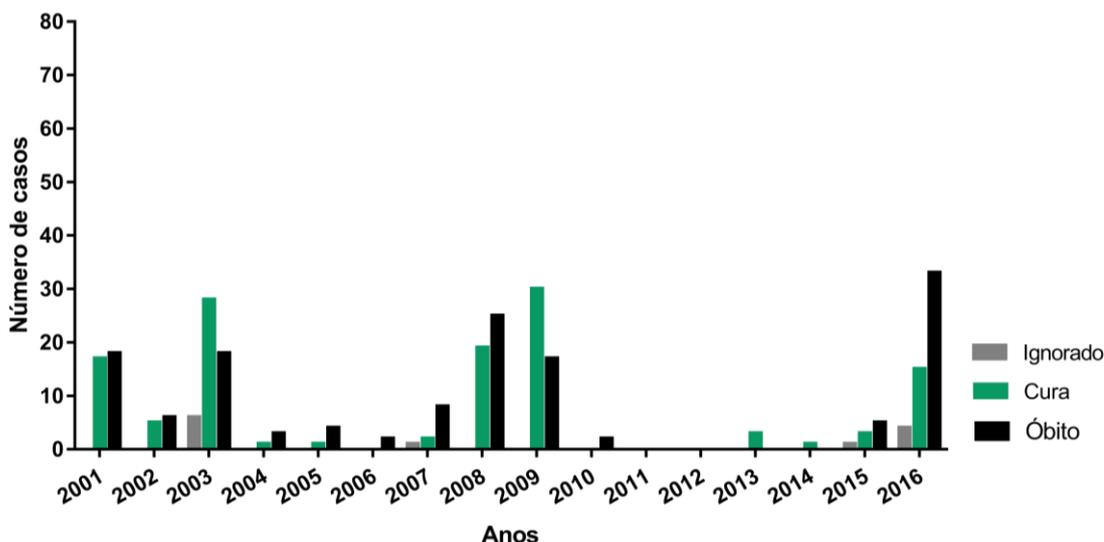


Figura 24: Desfecho clínico dos casos confirmados de Febre Amarela no período de 2001 a 2016. Representação gráfica do desfecho clínico observado para os casos de FA depositados na base de dados do SINAN. Cura: verde; Óbito: preto; Ignorado: cinza.

Com relação à faixa etária dos casos de FA confirmados, a maioria dos casos notificados nos anos analisados ocorreram em indivíduos com idade entre 20 e 39 anos (43,73%), seguidos pela faixa etária de 40 a 59 anos (31,29%) e por 15 a 19 anos, 7,91% (Figura 25).

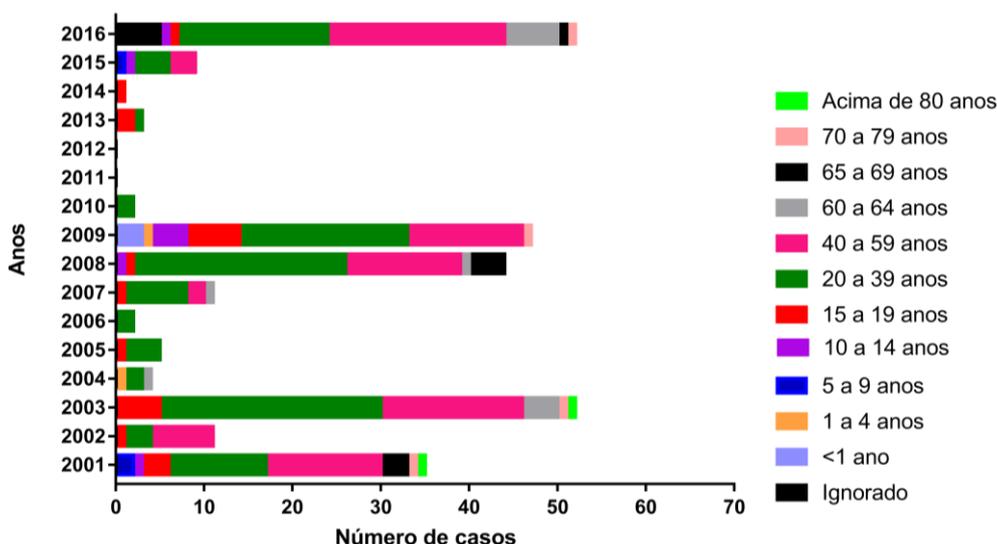


Figura 25: Número de casos de FA por faixa etária no período de 2001 a 2016. Representação gráfica do número de casos de FA distribuídos por faixa etária.

Diante de todos os dados apresentados, Minas Gerais merece destaque. Ao longo do período de 2001 a 2016, compreendido na base de dados do SINAN, Minas Gerais foi o estado com maior número de casos humanos notificados (n=128). Os anos com maior relevância foram os de 2001 (n=26), 2003 (n= 47) e 2016 (n=42) (Figura 26).

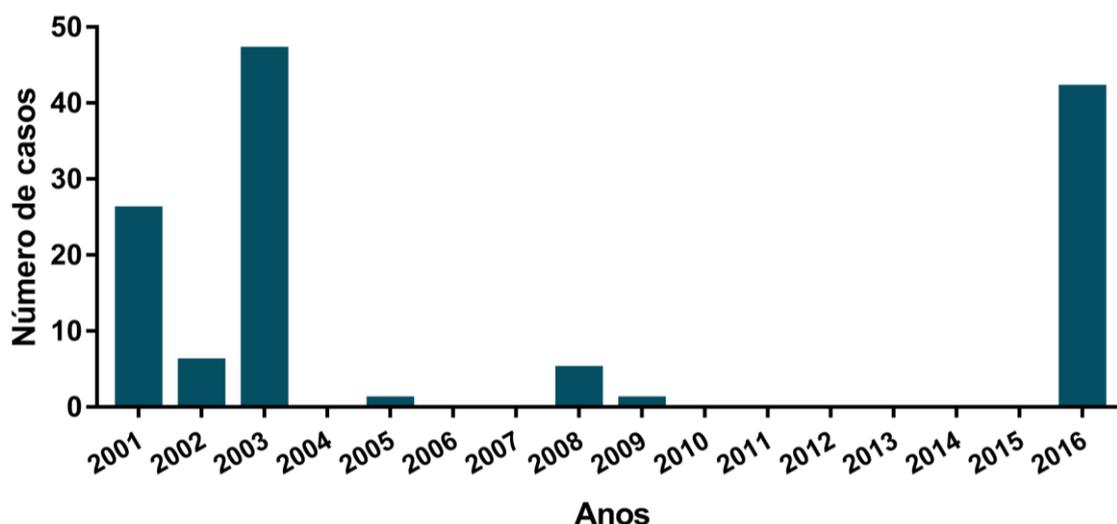


Figura 26: Casos confirmados de Febre Amarela em Minas Gerais. Representação gráfica do número de casos de FA em Minas Gerais no período de 2001 a 2016.

No que se referem aos municípios mineiros que apresentaram as notificações dos casos ao longo do período analisado, 39 municípios apresentaram notificações (Figura 27). São eles Alvorada de Minas, Belo Horizonte, Contagem, Bom Despacho, Divinópolis, Dom Joaquim, Guanhães, Lavras, Leandro Ferreira, Luz, Nova Serrana, Pará de Minas, Rio Paranaíba, Sabinópolis, Santo Antônio do Monte, Serra da Saudade, Serro, Caratinga, Delfinópolis, Entre Folhas, Imbé de Minas, Inhapim, Ipanema, Ipatinga, Itambacuri, Ladainha, Malacacheta, Muriaé, Novo Cruzeiro, Piedade de Caratinga, Poté, Pouso Alegre, São Sebastião do Maranhão, Teófilo Otoni, Ubá, Ubaporanga, Uberlândia, Vargem Alegre e Vespasiano. A maioria das cidades apresentou de uma a quatro notificações de casos de FA. O município com maior número de casos de FA foi Serro (n=21), seguido de Sabinópolis (n= 19), Belo Horizonte (n=11) e Ladainha (n=9).

Quando analisada a distribuição dos casos notificados por bioma presente no estado de Minas Gerais, observamos que a maioria dos casos ocorreu no domínio de bioma de Mata Atlântica, seguido do Cerrado. Nenhum caso foi observado em áreas com cobertura vegetal predominante de Caatinga.

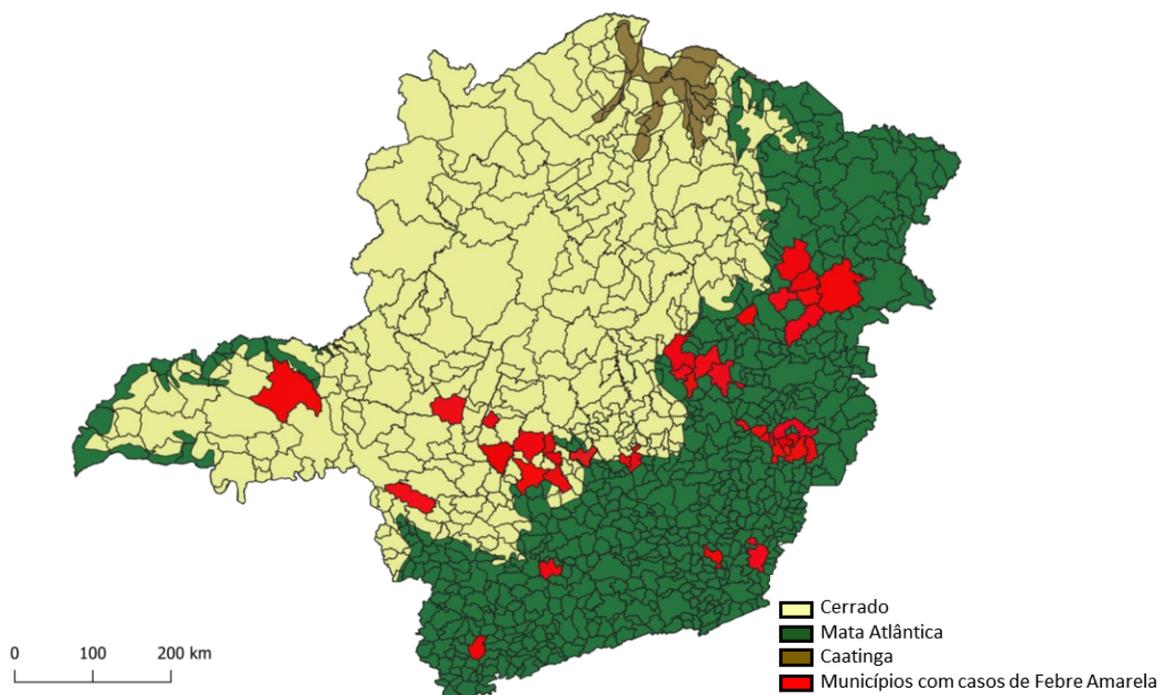


Figura 27: Mapa do estado de Minas Gerais com municípios com casos de Febre Amarela registrados. No mapa é evidenciada a distribuição dos biomas presentes no estado e em vermelho são destacados os municípios com casos de FA confirmados no período analisado de 2001 a 2016. Fonte: Autor, software QGIS.

6.2 Caracterização das populações analisadas

6.2.1 População rural do município do Serro

Com relação à população rural do município do Serro foram incluídos nesse estudo 218 participantes, sendo 115 homens (52,75%) e 103 mulheres (47,25%). A faixa etária predominante é de 19 a 40 anos ($n=89$; 40,82%) e a maioria dos participantes se considera como parda ($n=131$; 60,1%), seguido de negro ($n=52$; 23,85%) e branco ($n=35$; 16,05%). Em relação à renda a maioria dos participantes recebem um salário-mínimo ou menos ($n=16$; 74,3%), 7,8% recebem mais de um salário, sendo que 17,9% preferiram não responder. Quanto ao nível educacional a maior parcela dos indivíduos, 63,76%, cursou até o ensino fundamental ($n=139$), 26,14% cursaram o ensino médio ou mais ($n=57$) e 10,1% são analfabetos ($n=22$). Com relação à ocupação observou-se a predominância de trabalhadores rurais, 52,30% ($n=114$), seguidos por 25,68% de donas de casa ($n=56$) e 14,67% de estudantes ($n=32$), sendo o restante distribuído em Profissionais de saúde, Motoristas, Pedreiros, Funcionário Público e Zootecnista. A caracterização demográfica populacional é representada na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização demográfica da população rural do município do Serro. Coletas realizadas nos anos de 2012 e 2013.

Variáveis demográficas	Frequência (n)	(%)
Gênero		
Feminino	103	47,25%
Masculino	115	52,75%
Idade (anos)		
0-18	34	15,6%
19 – 40	89	40,82%
41-59	60	27,52%
≥ 60	35	16,06%
Etnia		
Pardo	131	60,1%
Branco	35	16,05%
Negro	52	23,85%
Nível educacional		
Analfabeto	22	10,1%
<= Nível Fundamental	139	63,76%
>= Nível Médio	57	26,14%
Renda		
<= 1 salário	162	74,3%
> 1 salário	17	7,8%
Ignorado	39	17,9%
Profissão		
Estudante	32	14,67%
Do lar	56	25,68%
Profissional da saúde	5	2,30%
Trabalhador rural	114	52,30%
Outros †	11	5,04%
Contato com o ambiente silvestre*		
Sim	107	49,08%
Não	111	50,92%
Total	218	100

†Outros: Pedreiro, motorista, funcionário público e zootecnista. * Apesar da população residir em área rural a pergunta sobre o contato com o ambiente silvestre foi incluída e se referia ao contato com áreas de mata pertencentes à propriedade investigada.

6.2.2 População urbana do município do Serro

Um total de 363 indivíduos da área urbana do município do Serro foram incluídos no estudo. Em relação ao sexo, 54% dos participantes foram do sexo feminino (n=196) e 46% do sexo masculino (n=167). A maioria dos participantes eram jovens adultos, com predomínio da faixa etária de 19 a 40 anos (n=127, 34,98%). Um maior número de participantes se considera pardo 63,09% (n= 229), seguido de branco 18,45% (n=67), negro 17,35% (n=63) e amarelo 0,83% (n= 3). Com relação à escolaridade a maioria possui ensino fundamental 52,07% (n=189), 34,99% estudaram até o ensino médio (n=127), 7,99% possuem ensino superior (n= 29) e 4,40% nunca frequentaram a escola (n= 16). Quanto à renda familiar mensal 38,84% recebem entre um e dois salários-mínimos (n= 141), 27,82% recebem menos ou um salário mínimo (n=101), 7,44% recebem de dois a três salários mínimos (n= 27), 2,76% recebem de três a quatro salários mínimos e 6,34% recebem um valor mensal acima de quatro salários, sendo que 16,80% ignoraram a questão. No que diz respeito às profissões os indivíduos estão bem distribuídos categoricamente, sendo que a maior parte se enquadra como prestadores de serviços gerais 25,07% (n= 90) (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização demográfica da população urbana do município do Serro, referente aos anos de 2015, 2017 e 2018.

Variáveis demográficas	Frequência (n)	(%)
Gênero		
Feminino	196	54%
Masculino	167	46%
Idade (anos)		
0 – 18	57	15,7%
19 – 40	127	34,98%
41– 59	103	28,37%
≥ 60	74	20,40%
Ignorado	2	0,55%
Etnia		
Pardo	229	63,09%
Branco	67	18,45%
Negro	63	17,35%
Amarelo	3	0,83%
Ignorado	1	0,28%

Tabela 2: Caracterização demográfica da população urbana do município do Serro, referente aos anos de 2015, 2017 e 2018.

Nível educacional		
Analfabeto	16	4,40%
<= Nível Fundamental	189	52,07%
Nível Médio	127	34,99%
Superior	29	7,99%
Ignorado	2	0,55%
Renda		
<= 1 salário	101	27,82%
1-2 salários	141	38,84%
2-3 salários	27	7,44%
3-4 salários	10	2,76%
Acima de 4 salários	23	6,34%
Ignorado	61	16,80%
Profissão		
Estudante	56	15,43%
Do Lar	66	18,18%
Aposentados	46	12,67%
Profissional de saúde	21	5,79%
Trabalhador Rural	32	8,82%
Comércio	19	5,23%
Serviços Gerais	91	25,07%
Outros †	16	4,41%
Desempregados	8	2,20%
Ignorado	8	2,20%
Total	363	100

†Outros: Advogada, Locutora, Bancária, Tabela, Engenheiro, Empresária, Funcionário Público, Assistente Social, Músico, Professor e Artista.

6.2.3 Fatores de exposição relacionados à Febre Amarela

Para a população urbana amostrada anos de 2017 e 2018, foram coletados juntamente com os dados demográficos hábitos comportamentais que podem ser relacionadas como fatores de exposição para a FA. Dentre os atributos questionados estão: contato com animais silvestres, hábito de frequentar locais de mata e propriedades rurais, histórico de vacinação contra Febre amarela, histórico da doença, infecção progressa por Dengue ou Zika (Tabela 3).

Com relação ao hábito de frequentar ambientes de mata 57,24% (n=178) afirmaram realizar essa prática. Quanto ao fato de frequentar propriedades rurais

197 participantes (63,35%) responderam possuir esse hábito e 32,48% (n=101) afirmaram já terem visto primatas não-humanos próximos aos ambientes de mata e as propriedades rurais que frequentam.

No que diz respeito à vacinação contra a Febre Amarela, 95,50% (n= 297) dos participantes responderam ser vacinados, e dentre estes a maioria afirma ter tomado uma (20,87%) ou duas doses da vacina (55,56%). Todos os participantes afirmaram que nunca tiveram FA e quando questionados se já apresentaram infecção por outras flaviviruses, nenhum participante confirmou ter contraído infecção por Zika e apenas 0,96% (n=3) relataram já ter adquirido Dengue.

Também foram questionados hábitos comportamentais que podem ter relação com possíveis agravamentos de casos de FA. O consumo de bebidas alcoólicas foi confirmado por 107 participantes, 34,41%, 14,79% (n=46) afirmaram ser fumantes e 97 (31,19%) participantes relataram possuir alguma doença crônica.

Tabela 3: Fatores de exposição para Febre Amarela.

Características	Frequência (n)	(%)
Frequenta local de mata		
Sim	178	57,24%
Não	131	42,12%
Ignorado	2	0,64%
Frequenta propriedades rurais		
Sim	197	63,35%
Não	113	36,33%
Ignorado	1	0,32%
Já viu primatas próximos a esses locais		
Sim	101	32,48%
Não	200	64,30%
Ignorado	10	3,22%
Vacinado contra Febre Amarela?		
Sim	297	95,50%
Não	7	2,25%
Ignorado	7	2,25%

Tabela 3: Fatores de exposição para Febre Amarela.

Quantas doses		
1	62	21%
2	125	42%
3	14	5%
Ignorado	96	32%
Já teve Febre Amarela?		
Sim	0	0%
Não	309	99,36%
Ignorado	2	0,64%
Já teve Dengue?		
Sim	3	0,96%
Não	308	99,04%
Já teve Zika?		
Sim	0	0%
Não	311	100%
Hábito de consumir bebidas alcoólicas		
Sim	107	34,41%
Não	203	65,27%
Ignorado	1	0,32%
Hábito de fumar		
Sim	46	14,79%
Não	265	85,21%
Possui alguma doença crônica*		
Sim	97	31,19%
Não	213	68,49%
Ignorado	1	0,32%
Total	311	100

*As doenças crônicas mais relatadas foram Diabetes, Hipertensão, problemas de saúde relacionados a colesterol alto e as vias respiratórias, como asma, bronquite e rinite.

Em relação ao contato com animais silvestres, que também pode ser considerado um fator de exposição à FA, esta questão estava incluída no inquérito epidemiológico da coleta realizada no ano de 2015. No total da população urbana

analisada nesse período, 24,52% (n=89) relataram ter contato com animais silvestres (Tabela 4).

Tabela 4: Fator de exposição para Febre Amarela.

Característica	Frequência (n)	(%)
Contato com animais silvestres		
Sim	89	24,52%
Não	272	74,93%
Ignorado	2	0,55%
Total	363	

6.2.4 Pacientes da SRS de Diamantina

Como as amostras de Diamantina são provenientes de pacientes que deram entrada na Superintendência Regional de Saúde de Diamantina com suspeita clínica de infecção por arbovírus o contexto de coleta se mostra bastante distinto com relação às amostras do Serro. Diante disso, como os dados demográficos são restritos não foi possível realizar as mesmas descrições e análises que foram feitas para as populações rural e urbana do Serro.

O total de 51 amostras de soro foi proveniente da SRS de Diamantina, sendo incluídos trinta homens (58,8%) e vinte e uma mulheres (41,2%). A faixa etária variou de dez a sessenta e seis anos, sendo que a maioria compreende a faixa de dezenove a quarenta anos (58,82%) (Tabela 5).

Tabela 5: Variáveis demográficas dos pacientes da SRS de Diamantina.

Variáveis demográficas	Frequência (n)	(%)
Gênero		
Feminino	21	41,2%
Masculino	30	58,8%
Idade (anos)		
0-18	5	9,8%
19 - 40	30	58,82%
41-59	12	23,52%
≥ 60	1	1,96%
Ignorado	3	5,88%
Total	51	100

6.3 Avaliação sorológica para Febre Amarela

Para a avaliação do perfil sorológico contra o vírus da Febre Amarela nas populações rural e urbana do Serro e para os pacientes de Diamantina, as populações foram analisadas pela técnica de PRNT em dois pontos de corte distintos. Essa estratégia foi adotada a fim de se realizar uma comparação entre as taxas de soroprevalência com os dois cut-offs, já que para áreas com co-circulação de flavivírus o preconizado é um cut-off mais restritivo ($\geq 90\%$), porém também são encontrados estudos no contexto de FA com cut-off de $\geq 50\%$.

6.3.1 População rural do município do Serro

A coleção da população rural do Serro correspondeu no total a 218 amostras. Para o teste de PRNT, considerando o ponto de corte $\geq 50\%$ de redução, 54 amostras (24,77%) foram negativas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 164 positivas (75,23%). Com o ponto de corte de $\geq 90\%$ de redução 142 amostras (65,14%) foram negativas e 76 positivas (34,86%) (Figura 28) (Figura 29).

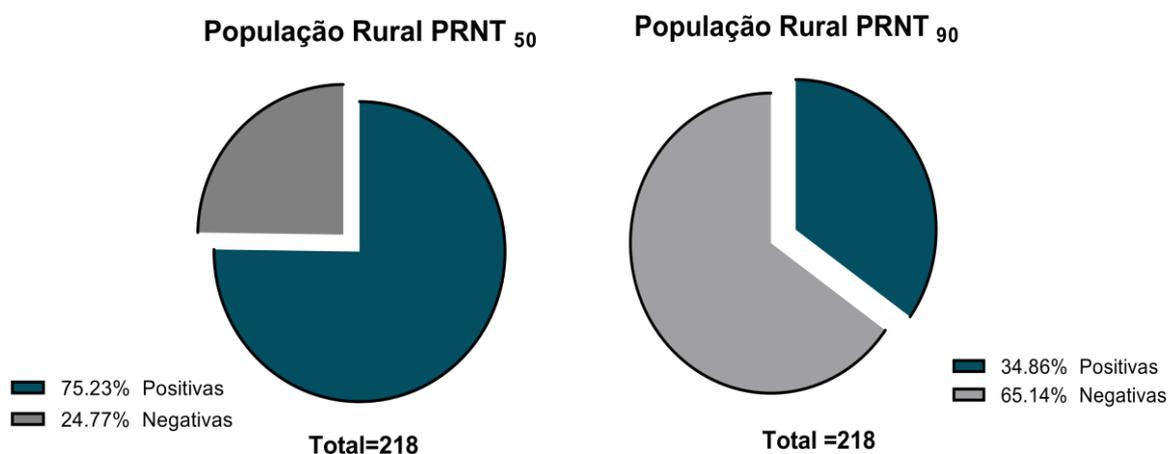


Figura 28: Resultados referentes aos ensaios de PRNT₅₀ e PRNT₉₀ para as amostras da população rural do município do Serro. São comparadas as porcentagens de amostras positivas e negativas considerando os dois pontos de corte.

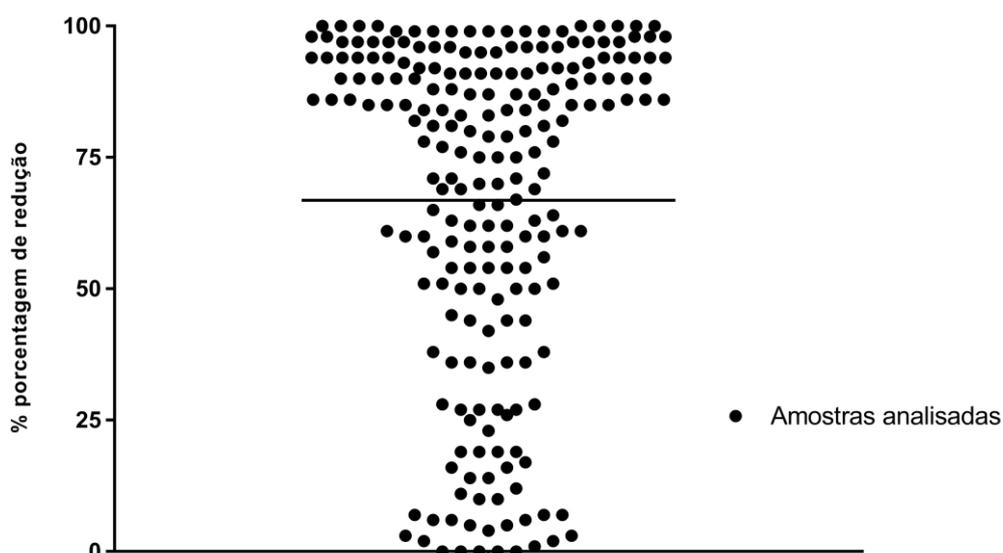


Figura 29: Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população rural do Serro em relação ao controle de vírus. A linha em destaque representa a média dos percentuais de redução de todas as amostras.

Ainda, considerando os dois pontos de corte da técnica de soroneutralização, $\geq 50\%$ ou $\geq 90\%$ de redução, foram realizadas análises estatísticas a fim de relacionar a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV com as variáveis demográficas e fatores de exposição avaliados.

Para a população rural as variáveis significativamente associadas à presença de anticorpos neutralizantes na PRNT₅₀ foram: Idade ($p < 0.001$), com indivíduos mais velhos apresentando maior probabilidade de possuírem anticorpos anti-YFV; etnia, pardos em relação a brancos ($p = 0.03606$), (OR = 2,525; IC95% = 1,057 – 5,902); profissão, trabalhador rural ($p < 0.001$), (OR = 5; IC95% = 1,949 – 12,7) e contato com ambiente silvestre ($p = 0.02772$), (OR = 0,4719; IC95% = 0,2368 – 0,9273).

Na PRNT₉₀ as variáveis significativamente associadas à presença de anticorpos neutralizantes foram: sexo masculino ($p = 0.03436$), (OR = 1,919; IC95% = 1,045 – 3,547) e contato com ambiente silvestre ($p = 0.02614$), (OR = 0,5063; IC95% = 0,2747– 0,9278) (Tabela 6).

Tabela 6: Variáveis demográficas e fatores de exposição associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV na população rural do Serro.

Variáveis Demográficas	N (%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₅₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₉₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)
		positivos	negativos		positivos	negativos	
Gênero							
Feminino	103 (47,25%)	74	29		28	75	0,03436 1,919
Masculino	115 (52,75%)	90	25		48	67	1,045-3,547
Idade	média em anos	41,8	27,9	p < 0.001	41,7	36,6	
Etnia							
Pardo*	131 (60,1%)	101	30	0,03606	42	89	
Branco	35 (16,05%)	25	15	2,525	10	25	
Negro	52 (23,85%)	43	9	1,057-5,902	24	28	
Nível Educacional							
Analfabeto	22 (10,1%)	20	2		10	12	
≤ Nível Fundamental*	139 (63,76%)	103	36		50	89	
≥ Nível Médio	57 (26,14%)	41	16		16	41	
Renda							
≤ 1 Salário*	162 (74,3%)	129	33		63	99	
> 1 Salário	17 (7,8%)	14	3		4	13	
Ignorado	39 (17,9%)	21	18		9	30	
Profissão							
Estudante	32 (14,67%)	16	16	0,00046	10	22	
Do lar	56 (25,68%)	42	14	5	19	37	
Profissional da Saúde	5 (2,3%)	4	1	1,949-12,7	0	5	
Trabalhador rural*	114 (52,30%)	95	19		44	70	
Outros**	11 (5,04%)	7	4		3	8	
Contato Ambiente Silvestre							
Sim	107 (49,08%)	73	34	0,02772	29	78	0,02614
Não	111(50,92%)	91	20	0,4719	47	64	0,5063
				0,2368-0,9273			0,2747-0,9278
Total	218						

**Outros: Pedreiro, motorista, funcionário público e zootecnista. *Categorias utilizadas como referência.

6.3.2 População Urbana do município do Serro

Com o intuito de facilitar a visualização de todos os dados da população urbana do município do Serro, o perfil de redução das amostras foi dividido em gráficos por ano de coleta, sendo ao todo 363 amostras de soro referentes à área urbana.

Para o ano de 2015, foram analisadas 52 amostras de soro. Considerando o ponto de corte $\geq 50\%$, 40 amostras (76,92%) foram positivas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 12 foram negativas (23,08%). Considerando o

ponto de corte em $\geq 90\%$ de redução 19 amostras (36,54%) foram positivas e 33 negativas (63,46%). A Figura 30 representa o perfil de redução de todas as amostras analisadas para o ano de 2015.

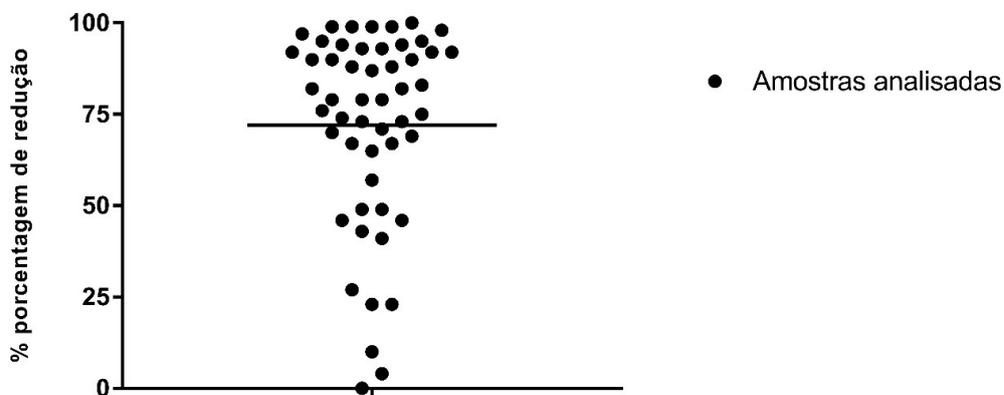


Figura 30: Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população urbana do Serro (2015) em relação ao controle de vírus. A linha em destaque representa a média dos percentuais de redução de todas as amostras.

Para o ano de 2017, foram analisadas 216 amostras de soro. Considerando o ponto de corte $\geq 50\%$ 148 amostras (68,52%) foram positivas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 68 foram negativas (31,48%). Entretanto considerando o ponto de corte de $\geq 90\%$ de redução 60 amostras (27,78%) foram consideradas positivas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 156 negativas (72,22%) (Figura 31).

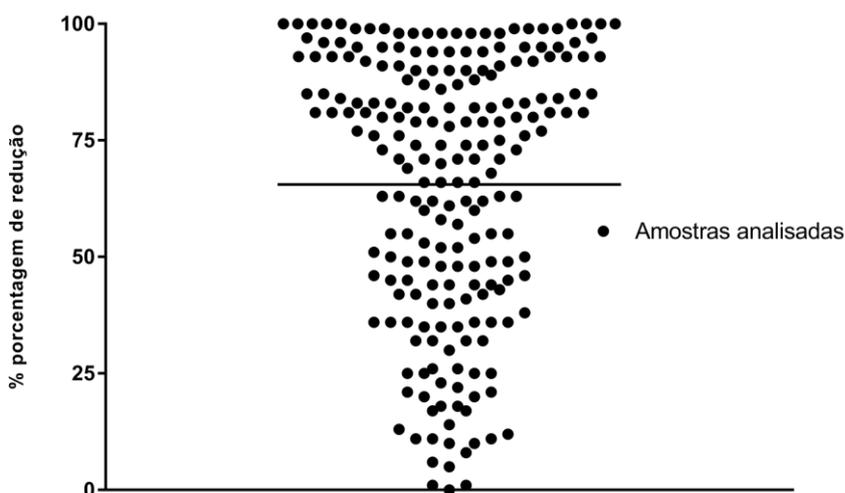


Figura 31: Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população urbana do Serro (2017) em relação ao controle de vírus. A linha em destaque representa a média dos percentuais de redução de todas as amostras.

Para a população analisada no ano de 2018, o total de amostras de soro foi 95. Considerando o ponto de corte $\geq 50\%$, 79 amostras (83,16%) foram positivas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 16 foram negativas (16,84%). Considerando PRNT₉₀ 32 amostras (33,68%) foram positivas para anticorpos anti-YFV e 63 negativas (66,32%) (Figura 32).

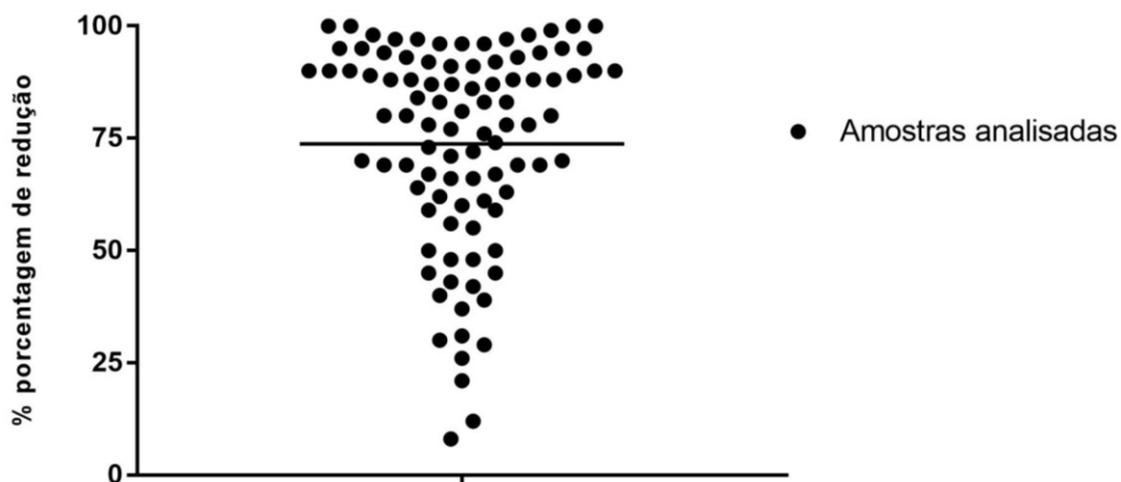


Figura 32: Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados referentes a população urbana do Serro (2018) em relação ao controle de vírus. A linha em destaque representa a média dos percentuais de redução de todas as amostras.

A tabela 7 evidencia a comparação das taxas de soroprevalência para os três anos de coleta na população urbana.

Tabela 7: Comparação da soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV para os três anos de coleta na área urbana.

População urbana	N	Amostras positivas PRNT ₅₀	Amostras positivas PRNT ₉₀
2015	52	76,92%	36,54%
2017	216	68,52%	27,78%
2018	95	83,16%	33,68%
Total	363		

Quando são consideradas todas as 363 amostras urbanas analisadas, para o ponto de corte de $\geq 50\%$ 96 amostras se mostraram negativas (26,45%) e 267 (73,55%) foram positivas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Para a PRNT₉₀, 252 amostras foram consideradas negativas (69,42%) e 111

positivas (30,58%) para a presença de anticorpos neutralizantes para Febre Amarela (Figura 33).

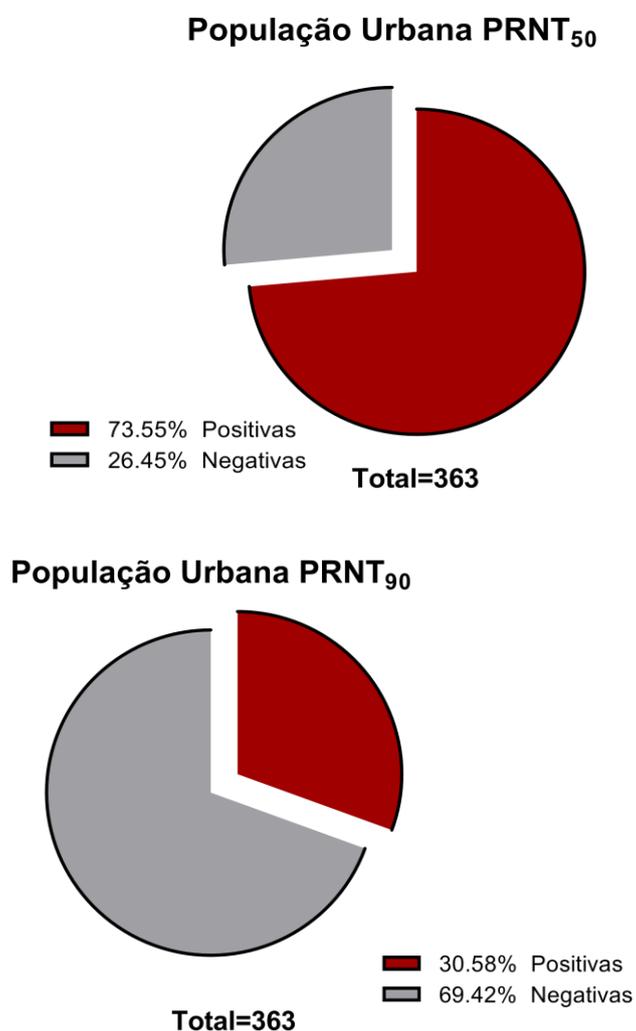


Figura 33: Resultados referentes aos ensaios de PRNT₅₀ e PRNT₉₀ para as amostras da população urbana do município do Serro. São comparadas as porcentagens de amostras positivas e negativas considerando os dois pontos de corte de PRNT₅₀ e PRNT₉₀ para as amostras de toda a população urbana do Serro incluída no estudo.

Para as análises estatísticas referentes à população urbana total do Serro, nenhuma das variáveis demográficas analisadas foi significativamente associada à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV, tanto quando para PRNT₅₀ quanto PRNT₉₀ (Tabela 8). Nessa análise foi incluído o fator de exposição de contato com animais silvestres que engloba os três anos de coleta da área urbana do Serro (2015, 2017 e 2018) o qual também não demonstrou correlação estatística com a presença de anticorpos neutralizantes.

Tabela 8: Variáveis demográficas e fatores de exposição associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Dados população urbana do Serro, anos 2015, 2017 e 2018.

Variáveis Demográficas	N (%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₅₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₉₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)
		positivos	negativos		positivos	negativos	
Gênero							
Feminino	196 (54%)	141	55		57	139	
Masculino	167 (46%)	126	41		54	113	
Idade	média em anos	41,5	39,3		41	40,9	
Etnia							
Pardo*	229 (63,09%)	168	61		72	157	
Branco	67 (18,45%)	49	18		15	52	
Negro	63 (17,35%)	48	15		23	40	
Amarelo	3 (0,83%)	1	2		0	3	
Ignorado	1 (0,28%)	1	0		1	0	
Nível Educacional							
Analfabeto	16 (4,40%)	12	4		5	11	
≤ Nível Fundamental*	189 (52,07%)	137	52		58	131	
≥ Nível Médio	127 (39,99%)	95	32		38	89	
Superior	29 (7,99%)	22	7		9	20	
Ignorado	2 (0,55%)	1	1		1	1	
Renda							
≤ 1 Salário	101 (27,82%)	73	28		34	67	
1-2 Salários*	141 (38,84%)	104	37		42	99	
2-3 Salários	27 (7,44%)	21	6		8	19	
3-4 Salários	10 (2,76%)	8	2		6	4	
> 4 Salários	23 (6,34%)	18	5		5	18	
Ignorado	61 (16,80%)	43	18		16	45	
Profissão							
Estudante	56 (15,43%)	36	20		17	39	
Do lar	66 (18,18%)	46	20		17	49	
Aposentados	46 (12,67%)	33	13		17	29	
Profissional de Saúde	21 (5,79%)	17	4		5	16	
Trabalhador Rural	32 (8,82%)	27	5		10	22	
Comércio	19 (5,23%)	12	7		6	13	
Serviços Gerais*	91 (25,07%)	68	23		26	65	
Outros**	16 (4,41%)	13	3		4	12	
Desempregados	8 (2,20%)	8	0		4	4	
Ignorados	8 (2,20%)	7	1		5	3	
Contato Animais Silvestres							
Sim	89 (24,52%)	64	25		21	68	
Não	272 (74,93%)	201	71		90	182	
Ignorado	2 (0,55%)	2	0		0	2	
Total	363						

**Outros: Advogada, Locutora, Bancária, Tabela, Engenheiro, Empresária, Funcionário Público, Assistente Social, Músico, Professor e Artista. *Categorias utilizadas como referência.

Também foi avaliada a correlação estatística da presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV com os fatores de exposição que fizeram parte do inquérito epidemiológico dos anos de 2017 e 2018. Para a população urbana os fatores de risco significativamente associadas à presença de anticorpos neutralizantes na PRNT₅₀ foram: Hábito de consumir bebidas alcólicas (p= 0.02043) (OR= 2,003; IC95%= 1,103 –3,74), Hábito de fumar (p= 0.02591) (OR= 2,781; IC95% = 1,107 – 8,331).

Na PRNT₉₀ os fatores de risco significativamente associadas à presença de anticorpos neutralizantes foram: Hábito de frequentar propriedades rurais (p= 0.03607) (OR = 1,814; IC95%= 1,036 – 3,234), e hábito de consumir bebidas alcólicas (p= 0.03507) (OR= 1,779; IC95%= 1,039 – 3,032) (Tabela 9).

Tabela 9: Fatores de exposição para FA associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Dados referentes à população urbana do Serro, anos de 2017 e 2018.

Fatores de exposição	N (%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₅₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₉₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)
		positivos	negativos		positivos	negativos	
Frequenta local de mata							
Sim*	178 (57,24%)	134	44		51	127	
Não	131 (42,12%)	92	39		41	90	
Ignorado	2 (0,64%)	1	1		0	2	
Frequenta propriedades rurais							
Sim*	197 (63,35%)	146	51		67	130	0,03607
Não	113 (36,33%)	81	32		25	88	1,814
Ignorado	1 (0,32%)	0	1		0	1	1,036-3,234
Primatas próximos a esses locais							
Sim	101 (32,48%)	75	26		36	65	
Não*	200 (64,30%)	145	55		51	149	
Ignorado	10 (3,22%)	7	3		5	5	
Vacinado contra Febre Amarela							
Sim*	297 (95,50%)	220	77		89	208	
Não	7 (2,25%)	4	3		2	5	
Ignorado	7 (2,25%)	3	4		1	6	
Quantas doses							
1	62 (19,93%)	44	18		22	40	
2*	125 (40,19%)	91	34		28	97	
3	14 (4,50%)	11	3		5	9	
Ignorado	96 (30,86%)	74	22		34	62	
Já teve Febre Amarela							
Sim	0 (0%)	0	0		0	0	
Não*	309 (99,36%)	225	84		92	217	
Ignorado	2 (0,64%)	2	0		0	2	

Tabela 9: Fatores de exposição para FA associados à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Dados referentes à população urbana do Serro, anos de 2017 e 2018.

Já teve Dengue							
Sim	3 (0,96%)	0	3		0	3	
Não	308 (99,04%)	227	81		92	216	
Já teve Zika							
Sim	0 (0%)	0	0		0	0	
Não	311 (100%)	227	84		92	219	
Hábito de consumir bebidas alcólicas							
Sim	107 (34,41%)	87	20	0,02043	40	67	0,03507
Não*	203 (65,27%)	139	64	2,003	51	152	1,779
Ignorado	1 (0,32%)	1	0	1,103-3,74	1	0	1,039 – 3,032
Hábito de fumar							
Sim	46 (14,79%)	40	6	0,02591	13	33	
Não	265 (85,21%)	187	78	2,781	79	186	
				1,107-8,331			
Possui alguma doença crônica							
Sim	97 (31,19%)	70	27		29	68	
Não*	213 (63,49%)	156	57		63	150	
Ignorado	1 (0,32%)	1	0		0	1	
Total	311						

*Categorias utilizadas como referência.

6.3.3 Soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV nas populações rural e urbana do Serro

Quando são comparados os dados de soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV para as populações rural e urbana do Serro, um total de 581 amostras, são observadas taxas de soroprevalência semelhantes entre as populações da área rural e da área urbana tanto na PRNT₅₀ quanto na PRNT₉₀ (Tabela 10).

Tabela 10: Comparação da soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV nas populações rural e urbana do Serro.

População do Serro	N	Amostras positivas PRNT ₅₀	Amostras positivas PRNT ₉₀
Rural	218	164 (75,23%)	76 (34,86%)
Urbana	363	267 (73,55%)	111 (30,58%)
Total	581		

6.3.4 Indivíduos com histórico de vacinação soronegativos

A partir da análise dos dados de histórico vacinal coletados por meio do questionário epidemiológico foi observado que dez indivíduos (19,2%) não apresentaram anticorpos neutralizantes anti-YFV detectáveis considerando PRNT₅₀. Todos os indivíduos são referentes a área urbana do Serro, sendo quatro homens e seis mulheres com faixa etária variando de nove a 62 anos (Tabela 11). Dentre estes, apenas um indivíduo apresenta comorbidades e outro participante de 18 anos apresentou três doses da vacina registradas.

Tabela 11: Participantes que comprovaram histórico de vacinação contra FA e não apresentaram anticorpos neutralizantes anti-YFV detectáveis.

Serro	Ano de coleta	Identificação da amostra	Sexo	Idade	Doença crônica	Datas de histórico vacinal	PRNT ₅₀
Área urbana	2017	9	F	51	Diabetes e bronquite	2003 - 2013	Negativa
Área urbana	2017	38	M	9	não	2009 - 2015	Negativa
Área urbana	2017	65	M	62	não	2001	Negativa
Área urbana	2017	87	F	15	não	2003	Negativa
Área urbana	2017	90	F	12	não	2006	Negativa
Área urbana	2017	91	M	10	não	2009 - 2016	Negativa
Área urbana	2017	92	M	18	não	2001 – 2003 – 2011	Negativa
Área urbana	2017	108	F	10	não	2008	Negativa
Área urbana	2017	113	F	29	não	2003 - 2015	Negativa
Área urbana	2017	117	F	17	não	2001	Negativa

6.3.5 Pacientes da SRS de Diamantina

Conforme mencionado anteriormente as amostras provenientes da SRS de Diamantina, são de indivíduos com suspeita clínica de arbovirose. Das 51 amostras de soro testadas, considerando o ponto de corte $\geq 50\%$ de redução, 37 amostras foram positivas (72,55%) para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 14 negativas (27,45%). Porém, quando considerado o ponto de corte de $\geq 90\%$ de redução, 18 amostras foram positivas (35,30%) para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV e 33 negativas (64,70%) (Figura 34) (Figura 35).

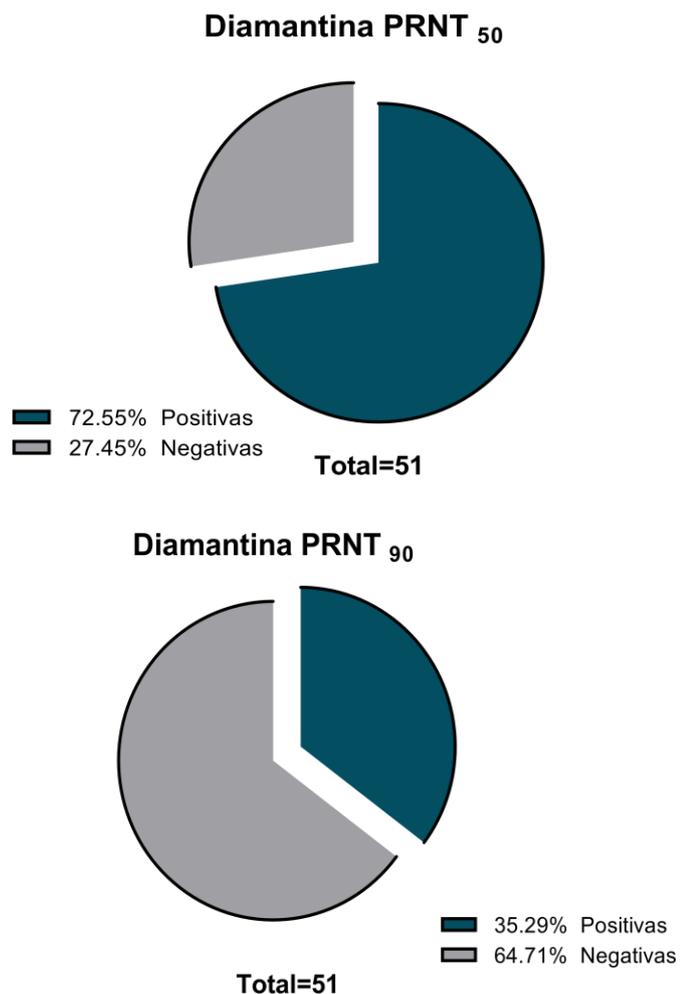


Figura 34: Resultados referentes aos ensaios de PRNT₅₀ e PRNT₉₀ para as amostras dos pacientes da SRS de Diamantina. São comparadas as porcentagens de amostras positivas e negativas considerando os dois pontos de corte de PRNT₅₀ e PRNT₉₀.

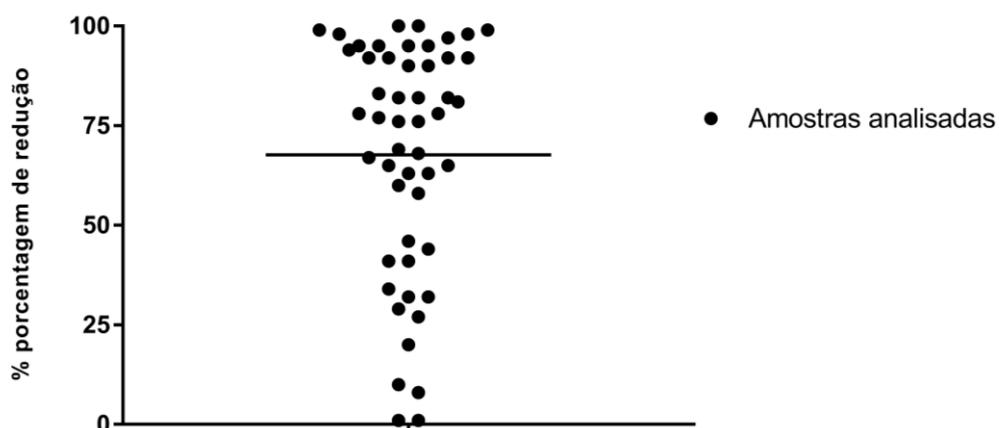


Figura 35: Porcentagem de redução de placas de lise dos soros testados dos pacientes de Diamantina em relação ao controle de vírus. A linha em destaque representa a média dos percentuais de redução de todas as amostras.

Para os dois pontos de corte de $\geq 50\%$ e $\geq 90\%$ de redução da técnica de soroneutralização, foram realizadas análises estatísticas a fim de relacionar a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV com as variáveis demográficas obtidas dos pacientes com suspeita de arbovirose.

Para as amostras de soro referentes aos pacientes da SRS de Diamantina, apenas na PRNT₉₀ a variável idade foi considerada significativa para a presença de anticorpos anti-YFV. Sendo que indivíduos mais velhos apresentaram maior probabilidade de possuírem anticorpos (Tabela 12).

Tabela 12: Variáveis demográficas associadas à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV.

Variáveis Demográficas	N (%)	Anticorpos neutralizantes PRNT ₅₀		Anticorpos neutralizantes PRNT ₉₀		Valor de p Odds ratio IC (95%)
		positivos	negativos	positivos	negativos	
Gênero						
Feminino	21 (41,2%)	16	5	8	13	
Masculino	30 (58,8%)	21	9	10	20	
Idade	média em anos	33	31,6	34	31,8	0,02456
Total	51					

6.4 Avaliação da reatividade cruzada com outros flavivírus: avaliação sorológica para Dengue

Uma das limitações deste estudo é a possibilidade da existência de reatividade cruzada entre os flavivírus. Visando minimizar esse viés foi realizada a triagem de todas as amostras de soro para os quatro sorotipos de Dengue por teste imunocromatográfico e para DENV-1 por meio do teste de ELISA.

Esses testes foram escolhidos ao invés da PRNT, que é o padrão ouro para diagnóstico sorológico de flavivírus devido à restrição na quantidade de soro para algumas amostras (os soros da população rural já haviam sido utilizados em dois outros estudos) e ao tempo escasso para repetir os testes de soroneutralização para todas as amostras e para todos os outros flavivírus. Os testes de ELISA para DENV-1 e o teste imunocromatográfico foram escolhidos pela disponibilidade por demandarem menor tempo de execução e apresentarem menor custo do que a PRNT. A escolha do DENV é justificada pela circulação frequente desse vírus no Brasil e no estado de Minas Gerais, sendo que o número de casos prováveis de

Dengue em Minas Gerais foi de 25.949 no ano de 2017 e 30.357 em 2018 (SVS, 2019).

6.4.1 População rural do município do Serro

Todas as 218 amostras de soro da coleção rural foram submetidas a realização de teste rápido para detecção de anticorpos para DENV-1, 2, 3 e 4. Foram positivas para anticorpos IgG o total de seis amostras de soro (2,75%), e anticorpos IgM foram detectados em cinco amostras (2,30%).

Ainda para a população rural do município do Serro, 217 amostras de soro (uma não apresentava mais volume suficiente) foram testadas também para a presença de anticorpos IgG anti-DENV-1 pelo teste de ELISA. Entre estas, 22 apresentaram anticorpos IgG para DENV-1, o que representa uma prevalência global de 10%. As amostras de soro com volume insuficiente foram excluídas dessa análise.

6.4.2 População Urbana

Considerando os resultados referentes ao teste rápido para DENV-1, 2, 3 e 4, todas as 363 amostras da coleção urbana do Serro foram analisadas, sendo que foram positivas para anticorpos IgG 20 amostras de soro (6%) e para os anticorpos IgM oito amostras (2%).

Ainda, referente a esta população, 355 amostras de soro foram testadas também para a presença de anticorpos IgG anti-DENV-1. As amostras de soro com volume insuficiente foram excluídas dessa análise. Entre todas as amostras analisadas, 38 apresentaram anticorpos IgG para DENV-1, o que representa uma prevalência global de 10,7%.

6.4.3 Pacientes da SRS de Diamantina

Das 51 amostras provenientes de Diamantina, oito foram positivas (15,69%) para a presença de IgG para DENV-1 no ELISA. E em relação ao teste rápido também para Dengue, 14 foram IgG positivas (27,45%) e três IgM positivas (5,88%).

6.4.4 Comparação da presença de anticorpos anti-DENV nas populações rural e urbana do Serro

Quando são comparados os dados de soroprevalência de anticorpos anti-DENV para as populações rural e urbana do Serro, para as análises por teste rápido é observado que para as duas populações a porcentagem de positividade ficou em torno de 2%. Somente para a presença de IgG na população urbana foi observada uma porcentagem de positividade maior, 6% (Tabela 13).

Tabela 13: Comparação da soroprevalência de anticorpos anti-DENV nas populações rural e urbana do Serro.

População do Serro	N	Amostras positivas IgG teste rápido	Amostras positivas IgM teste rápido
Rural	218	6 (2,7%)	5 (2,3%)
Urbana	363	20 (6%)	8 (2%)
Total	581		

Quanto ao teste de ELISA para IgG anti-DENV-1, foi observada maior positividade nas duas populações. As duas populações apresentaram taxas de positividade similares (Tabela 14).

Tabela 14: Comparação da soroprevalência de anticorpos IgG anti-DENV1 nas populações rural e urbana do Serro.

População do Serro	N	Amostras positivas ELISA DENV-1
Rural	217	22 (10%)
Urbana	355	38 (10,7%)
Total	572	

Em uma análise global, considerando o total de amostras de todas as populações submetidas a realização do teste rápido, 40 foram positivas para IgG e 16 para IgM. Considerando as positivas para IgG, 31 foram positivas também PRNT₅₀ e 16 considerando a PRNT₉₀ (ponto de corte mais restritivo). Com relação as amostras positivas em IgM, 13 foram positivas também considerando PRNT₅₀ e 8 considerando PRNT₉₀.

Com relação ao ELISA, para todas as populações, 68 amostras foram positivas para DENV-1, destas 53 foram positivas também na PRNT₅₀, e 22 foram positivas também na PRNT₉₀ para YFV (Figura 36).

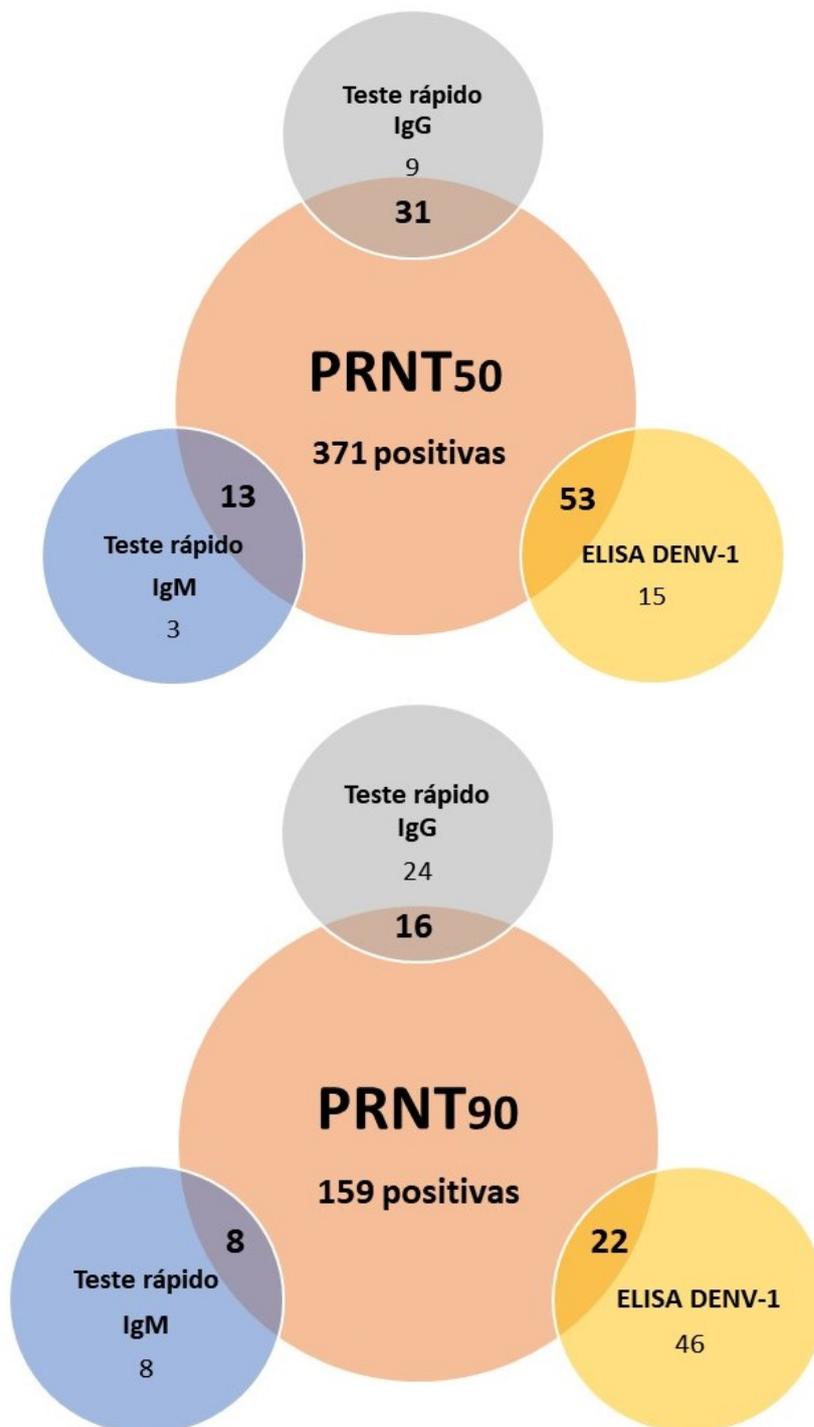


Figura 36: Diagramas de Venn demonstrando os dados dos três testes sorológicos realizados. Para cada ponto de corte da soroneutralização para YFV (PRNT₅₀ e PRNT₉₀) são evidenciadas o número de amostras positivas também nos testes imunocromatográficos e ELISA DENV-1 realizados nesse estudo.

7. DISCUSSÃO

A recente epidemia de FA no Brasil é a mais grave relatada em décadas, e apresentou um número expressivo de casos humanos, 2.155 confirmados desde 2016. A reemergência de casos humanos no país e a expansão da circulação viral para estados que anteriormente eram consideradas livres da doença elevam o risco de populações susceptíveis ficarem expostas a novos surtos, além de apontar para o risco de reurbanização da FA que não apresenta transmissão urbana no Brasil desde 1942 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; FARIA *et al.*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; POSSAS *et al.*, 2018). Diante de todo esse cenário, fica evidente que a circulação do YFV não está mais confinada a áreas florestais, concentradas especialmente nas regiões amazônicas, e que a transmissão no ciclo enzoótico está ocorrendo nas periferias de grandes centros urbanos, como observado na região sudeste e no estado de Minas Gerais, que pode ser considerado epicentro dessa epidemia.

As análises dos dados obtidos do SINAN demonstraram que, na história recente da ocorrência de surtos de FA no Brasil, os anos com maior número de casos no período analisado foram 2001, 2003, 2008, 2009 e 2016. Porém foi observado através de outros dados cedidos pelo Ministério da Saúde o início da epidemia atual no final de 2016, com um aumento expressivo e exponencial do número de casos a partir de 2017 e 2018. Segundo Vasconcelos (2010), a ocorrência de epizootias pode ocorrer de acordo com uma periodicidade, por volta de cinco a sete anos de intervalo. E essa periodicidade pode ser explicada pela renovação de populações de PNH que são importantes na amplificação viral. Porém vale salientar que múltiplos fatores atuam nesse contexto e periodicidade, a exemplo de fatores virais, diferentes ecossistemas e espécies de PNH ao longo de toda extensão territorial brasileira. Todavia, diante dessa hipótese, a confirmação de casos humanos notificados nesses anos pode estar relacionada também ao início de novos surtos em PNH e consequente transmissão para seres humanos inseridos em áreas próximas a esses ciclos silvestres.

Também vale ressaltar que de acordo com os dados do SINAN os estados mais atingidos pela FA foram o Amazonas, que historicamente já estava inserido na área que era considerada endêmica para a doença, Goiás, Rio Grande do Sul e os estados da região sudeste do país, com destaque para Minas Gerais. Esse padrão

reforça a expansão da circulação viral do YFV observada para o sentido leste sul do país ao longo dos últimos anos (VASCONCELOS, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; POSSAS *et al.*, 2018).

No período de 2001 a 2016, a Febre Amarela atingiu principalmente indivíduos do sexo masculino (84,17%), em idade economicamente ativa. De todos os casos notificados no período, a taxa de óbitos foi de 50,72%. De acordo com o Ministério da Saúde (2018), esse perfil demográfico é o esperado, correspondendo com padrões de surto silvestre, onde a grande maioria dos casos é observada em pacientes do sexo masculino, jovens adultos em idade economicamente ativa. Os homens geralmente são mais afetados pela FA devido a fatores comportamentais, pelo fato de se exporem mais a áreas rurais ou de mata em decorrência de atividades laborais e a menor cobertura vacinal quando comparados às mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; SES/ MG, 2018).

O estado de Minas Gerais foi o que mais apresentou casos de FA no período compreendido pela base de dados, sendo confirmados 128 casos entre os anos de 2001 e 2016. Ainda, de acordo com os dados do SINAN, a maioria dos municípios mineiros com notificações de casos de FA se concentraram no bioma de Mata Atlântica, porém alguns municípios com notificação estão inseridos no bioma de Cerrado. A cobertura vegetal de Minas Gerais abrange o bioma de Cerrado pela porção centro-ocidental, ocupando 57% da extensão territorial, a Mata Atlântica localizada na porção oriental ocupando 41% do território, e o bioma de Caatinga abrangendo 3,48% do território, na porção norte do estado (IEF, 2018). Um fator que pode fundamentar a ocorrência da maioria dos casos no bioma de Mata Atlântica, é o seu maior índice pluviométrico, o que poderia favorecer a proliferação dos mosquitos vetores. Contudo, são fatores primordiais para ocorrência de novos surtos de FA, a disponibilidade nesses biomas de espécies de PNH susceptíveis e mosquitos vetores competentes. Considerando essa perspectiva, o município do Serro, o qual apresentou o maior número de casos no período analisado, encontra-se numa área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica e a presença de áreas florestais fragmentadas e grande parte da população residindo em área rural podem ser fatores que contribuíram para o elevado número de casos observado (COSTA, 2005; IBF, 2018).

Devido ao histórico de casos de FA no Serro e ao fato de ser uma área de risco para a transmissão da doença, além dos estudos progressos realizados pelo

grupo de Ecologia de Virose Emergentes na cidade, esse foi o município escolhido neste estudo para avaliar o perfil sorológico contra o YFV nas populações rural e urbana.

Até o ano de 2002 o Serro estava inserido em uma área considerada indene para a FA. Nos anos de 2002 e 2003 ocorreu um surto de Febre Amarela silvestre atingindo os municípios da Regional de Saúde de Diamantina, sendo confirmados 63 casos de FA, com 40% destes confirmados no Serro. Nesse surto, foram atingidos principalmente moradores de uma comunidade rural chamada Lucas, sendo que a região dista de aproximadamente 250km do local onde havia ocorrido a última epidemia em Minas, em Divinópolis, no ano de 2001 (SVS, 2003; COSTA, 2005; RIBEIRO; ANTUNES, 2009). A ação antrópica no Serro é significativamente associada às atividades de agricultura e produção de derivados de leite, sendo que essas atividades relacionadas ao âmbito rural contribuem para o desmatamento e consequente formação de fragmentos de mata, fatores importantes no contexto de transmissão da FA (COSTA, 2005; SVS, 2003).

Sabe-se que os PNH são considerados animais sentinelas auxiliando na detecção precoce, identificação e vigilância de enfermidades que podem acometer a espécie humana, entre elas a FA. Durante o surto do Serro em 2002, os moradores relataram a Secretaria de Vigilância em Saúde do estado a presença de PNH nas matas locais. Foram identificados os gêneros *Alouatta* (guariba), *Cebus* (guigó) e *Callithrix* (soim), sendo que a presença de soim foi descrita pelos moradores em áreas de peridomicílio. Na comunidade rural de Lucas, onde foram confirmados os primeiros casos de FA nesse surto foi identificada epizootia por FA próxima as residências (SVS, 2003; COSTA, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2012; ESTRADA *et al.*, 2017). Fatos que corroboram com o questionário demográfico e epidemiológico aplicado nesse estudo, o qual coletou informações acerca do contexto da região e possíveis fatores de exposição a FA que poderiam possibilitar a transmissão e manutenção viral no local.

Para a população rural, na qual as coletas foram realizadas antes do início desse estudo, com relação a fator de exposição para FA foi questionado apenas o hábito de ter contato com ambiente silvestre. Do total de participantes a maioria respondeu não ter esse hábito (50,92%), porém, uma parcela de 49,08% declarou que possui contato com ambientes silvestres e de mata. Sendo que contato com

ambiente silvestre foi uma variável significativa nas análises estatísticas para a presença de anticorpos neutralizantes.

Com relação à população urbana, dados epidemiológicos acerca da FA foram incluídos no questionário aplicado, e 57,24% dos participantes relataram ter contato com ambiente de mata e 63,35% frequentam propriedades rurais, o que acaba colocando a população urbana em áreas com possível risco de transmissão assim como os moradores da população rural. Por meio das informações do questionário também foram relatados hábitos como o de buscar lenha na mata e de pescar que podem contribuir para a exposição dos indivíduos a áreas com circulação viral. Os participantes da área urbana também foram questionados quanto ao fato de já terem visto próximo ao peridomicílio e nas áreas de mata que frequentam a presença de PNH, e 32,48% dos entrevistados afirmaram terem visto esses animais. Sendo que os mais avistados foram os animais do gênero *Callithrix* (popularmente conhecidos na região como soim), em locais próximos ao bairro, no quintal de casa e em ambientes em que buscavam lenha ou costumavam pescar.

A soroneutralização, método sorológico realizado nesse projeto, é o teste diagnóstico mais específico para a detecção de anticorpos neutralizantes anti-YFV. Porém a aplicação do teste de PRNT para diagnóstico clínico em situações de surto é limitada devido à necessidade de um cultivo celular, pessoal altamente treinado, tempo para interpretação dos resultados e ao custo elevado (NIEDRIG *et al.*, 1999; WHO, 2007; JONKER *et al.*, 2013; MAEDA; MAEDA, 2013; DOMINGO *et al.*, 2018).

Com relação ao “cut-off” da PRNT (porcentagem de redução de placas de lise para considerar uma amostra positiva) não existe uma unanimidade. Os resultados podem ser baseados em um “cut-off” de 50% de redução em relação ao controle de vírus ou mais. Porém, de acordo com orientações da OMS os títulos na PRNT₅₀ são mais variáveis e considerando a reatividade cruzada entre os flavivírus, principalmente em áreas endêmicas e onde ocorre a co-circulação de muitos flavivírus é indicado considerar o ponto de corte de 90% (PRNT₉₀) (WHO, 2007; MAEDA; MAEDA, 2013; OMS, 2017; DOMINGO *et al.*, 2018).

Estudos anteriores de avaliação sorológica da imunidade contra flavivírus usaram “cut-offs” distintos. O estudo de Miyaji e colaboradores (2017), por exemplo, que buscava avaliar a prevalência de títulos de anticorpos neutralizantes entre pessoas previamente vacinadas contra FA utilizou PRNT₅₀, além de Mansfield e colaboradores (2011). Em contrapartida, outros estudos empregaram ponto de corte

de 90% para detectar anticorpos contra flavivírus em soros humanos e em macacos-prego no nordeste do Brasil (JOHNSON *et al.*, 2009; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2017), além de estudos baseados em resultados de PRNT₈₀ (HEPBURN *et al.*, 2006).

Assim, neste estudo para as 632 amostras de soro humano testadas por meio da técnica de PRNT, foram considerados dois pontos de corte, um de PRNT₅₀ e outro PRNT₉₀. Para a população rural do município do Serro a soroprevalência foi de 75,2% de indivíduos positivos para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV na PRNT₅₀ e de 34,8% com o ponto de corte mais restritivo da PRNT₉₀. Da mesma forma que para a população rural, na população urbana do Serro o “cut-off” de PRNT₉₀ também diminuiu a soroprevalência de anticorpos anti-YFV de 73,5% para 30,5%. Estabelecendo uma comparação das taxas de soroprevalência encontradas para os anos de 2015, 2017 e 2018 referentes a área urbana do Serro é observado que a soroprevalência de anticorpos anti-YFV é bastante homogênea nesse período, tanto para os resultados de PRNT₅₀ quanto PRNT₉₀. Quanto aos pacientes da SRS de Diamantina, foi observado que para a PRNT₅₀ a porcentagem de indivíduos soropositivos para anticorpos neutralizantes anti-YFV foi de 72,5% e para PRNT₉₀ foi de 35,3%

Quando comparada a soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV nas populações rural e urbana do Serro, foram observadas taxas de soroprevalência próximas, tanto na PRNT₅₀ quanto na PRNT₉₀. Esse panorama pode ser explicado pelo fato de que provavelmente, tanto a população rural como a urbana do município foram contempladas de forma equitativa nas campanhas de vacinação contra FA. Outro dado que merece destaque é a soroprevalência dos indivíduos que apresentaram anticorpos anti-YFV com relação a faixa etária. De acordo com os dados do SINAN a faixa etária mais acometida pela FA são os indivíduos de 20 a 59 anos, em idade economicamente ativa. Assim, realizando uma comparação com os nossos dados da soroneutralização, para a área urbana na PRNT₅₀ 64,8% dos indivíduos que apresentaram anticorpos anti-YFV estão incluídos nessa faixa etária e para a PRNT₉₀ 62%. Para a área rural a soroprevalência nessa faixa etária foi de 65,8% dos indivíduos na PRNT₅₀ e de 57,9% na PRNT₉₀. De acordo com os dados epidemiológicos a faixa etária de 20 a 59 anos compreende a população de maior risco para a FA e os nossos dados de soroprevalência mostram que a maioria dos indivíduos soropositivos nas duas populações rural e urbana se agrupam nessa faixa

etária economicamente ativa, sugerindo que essa parcela da população do Serro tem proteção contra FA.

Toda a área territorial de Minas Gerais é considerada área de recomendação de vacinação para FA desde 2008, no entanto atualmente o número de não vacinados ultrapassa 3,1 milhões de pessoas. A cobertura vacinal atual contra FA é de 91,11%, abaixo da meta de 95% preconizada pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; SES/MG, 2018). Em 2017 foram distribuídas no estado 9.899.866 doses da vacina e 3.997.085 doses em 2018. Segundo dados da SES/MG, nos últimos anos (2017-2019) a cobertura vacinal acumulada contra FA no Serro apresentou progresso de 84,3% para 98,7%, sendo aplicadas 20.459 doses da vacina 17DD entre 2007 e 2018 (SES/MG, 2018). Essa evolução da cobertura vacinal no município pode ser correlacionada ao início do surto de FA em dezembro de 2016, o qual contribuiu para a intensificação de campanhas de vacinação visando proteger as populações residentes em áreas com risco para a transmissão da doença.

Durante as coletas na área urbana do Serro referentes aos anos de 2017 e 2018, dos 311 indivíduos amostrados 95,50% dos entrevistados relataram ter se vacinado previamente contra FA, sendo que 42% destes afirmaram ter tomado duas doses da vacina antiamarílica. Porém, esses dados não podem ser considerados conclusivos já que apenas 52 participantes apresentaram no momento da entrevista o cartão de vacinação. E de acordo com os resultados da soroneutralização destes 52 indivíduos vacinados, 42 foram positivos na PRNT₅₀ e apenas 18 foram positivos na PRNT₉₀. Os dados demonstraram quase 20% (10/52) de indivíduos soronegativos que apresentaram histórico de vacinação contra o YFV. Esses dados merecem destaque, pois sugerem uma falha na soroconversão desses indivíduos, sendo que estudos anteriores já relataram casos de indivíduos previamente vacinados contra FA que desenvolveram a infecção natural. Um exemplo é o estudo de Miyaji e colaboradores (2017) que analisou a prevalência e os títulos de anticorpos neutralizantes anti-YFV em indivíduos previamente vacinados, e dentre os 94 indivíduos analisados encontrou 10% de soronegativos para FA. Sendo que dentre os nove indivíduos soronegativos, seis haviam sido vacinados a menos de dez anos (TUBOI *et al.*, 2006; MIYAJI *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2018).

Com relação aos dados demográficos e epidemiológicos coletados, alguns se mostraram estatisticamente relacionados à presença de anticorpos neutralizantes

anti-YFV. No que diz respeito à população rural para a PRNT₅₀, as variáveis demográficas significativas foram: idade, com indivíduos mais velhos apresentando maior probabilidade de possuírem anticorpos anti-YFV, provavelmente essa correlação pode ser explicada pela maior probabilidade de indivíduos mais velhos terem se vacinado, e devido a possibilidade de já terem se vacinado mais vezes em relação a indivíduos mais jovens. A etnia, com pardos apresentando 2,5 vezes mais chance de possuir anticorpos do que brancos, porém essa correlação pode ser devido ao maior número de pardos participantes do estudo. E profissão, com trabalhadores rurais apresentando uma possibilidade 5 vezes maior de ter anticorpos do que estudantes, esse dado pode ser correlacionado ao fato de trabalhadores rurais estarem mais expostos a ambientes de risco para FA. Para a PRNT₉₀ foi significativo a variável sexo, com homens apresentando possibilidade duas vezes maior de possuir anticorpos, provavelmente devido ao contato mais frequente com áreas de mata.

Para as análises estatísticas referentes a população urbana do Serro, nenhuma das variáveis demográficas analisadas foi significativamente associada à presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV, tanto quando para PRNT₅₀ quanto PRNT₉₀. No que diz respeito aos fatores de exposição, foram significativos para PRNT₅₀: o hábito de consumir bebidas alcoólicas e o hábito de fumar, onde indivíduos que apresentam esses hábitos possuem 2 vezes mais chances de possuir anticorpos anti-YFV. Essa correlação pode ser explicada pela maior parte dos indivíduos que bebem e fumam estarem inseridos em uma faixa etária de 20-59 anos, a qual foi a maioria para a soroprevalência para anticorpos anti-YFV de acordo com os resultados encontrados. Vale destacar que esses dois hábitos são importantes fatores de risco para o agravamento do quadro clínico em diversas doenças (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH-USA, 2007; GAYDOS *et al.*, 2016).

Ainda para a população urbana, na PRNT₉₀ o hábito de frequentar propriedades rurais foi significativo, sendo que indivíduos que afirmaram realizar esse hábito apresentam maior probabilidade de possuir anticorpos neutralizantes anti-YFV com relação aos que não, além do hábito de consumir bebidas alcoólicas, que pode ser interpretado da mesma maneira como descrito acima.

Com relação aos pacientes da SRS de Diamantina a variável demográfica de idade foi significativa na PRNT₉₀, sendo que indivíduos mais velhos apresentaram maior probabilidade de possuírem anticorpos comparados com indivíduos mais

jovens, essa análise também pode ser explicada pela maior probabilidade de indivíduos mais velhos terem se vacinado, e com mais doses da vacina em relação a indivíduos mais jovens.

As amostras de soro de todas as populações foram analisadas também para a presença de anticorpos direcionados para DENV. Para o teste rápido imunocromatográfico para os quatro sorotipos de dengue 40 amostras foram positivas para IgG (6,3%) e 16 para IgM (2,5%). Com relação ao teste de ELISA IgG DENV-1, para todas as 623 amostras testadas 68 amostras (10,7%) foram positivas. Merece destaque o fato de que durante a realização do inquérito epidemiológico no Serro, apenas três indivíduos (0,96%) da área urbana relataram infecção prévia por dengue. Além disso, diante da presença de amostras IgM positivas vale destacar que nenhum indivíduo apresentava sintomas de dengue durante as coletas, assim os indivíduos do Serro podiam ser no momento da coleta dengue assintomáticos (DUONG *et al.*, 2015).

Quando comparadas as populações rural e urbana do Serro quanto à positividade para anticorpos de dengue, no ELISA DENV-1 a porcentagem de positividade foi de 10% para as duas populações, sugerindo uma taxa de exposição a doença bem semelhante nas duas regiões amostradas. Para a presença de IgM por meio do teste imunocromatográfico, também foram observadas taxas próximas de 2% de soropositividade, e apenas para IgG foi observado 6% de positividade para a população urbana em comparação com 2,7% da população rural.

Dentre as amostras dos pacientes da SRS de Diamantina, três foram positivas para IgM, resultado que corrobora com o esperado já que essas amostras foram provenientes de pacientes com suspeita clínica para arbovirose. Também devido a esse contexto, era esperada a maior positividade para dengue das amostras da SRS de Diamantina (15,69% para IgG DENV-1, 27,45% para IgG e 5,8% para IgM no teste rápido) em relação a população do Serro analisada. De acordo com nosso colaborador, a maioria das amostras apresentou quadro clínico de dengue sem sinais de alarme, com desfecho benigno e sem internação (OLIVEIRA, D.B. dados não publicados).

Todavia, diante dos resultados encontrados não se pode afirmar se há reatividade cruzada e o nível de anticorpos direcionado a cada possível infecção. Mas a possibilidade de que os indivíduos tenham sido expostos a alguma infecção prévia de dengue e também tenham sido vacinados ou expostos a FA é real, já que

na região já foi relatada a circulação desses dois vírus. De acordo com o último Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue em Minas Gerais, o município do Serro apresenta baixa incidência de casos da doença, sendo que de 2007 a 2012 foram confirmados nove casos de dengue no município de acordo com o DATASUS (MOURA *et al.*, 2016; SES/MG, 2018).

Com base nos resultados encontrados na soroneutralização, o número de amostras negativas para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV pode ser considerado alto. Para o total de 581 participantes amostrados no município do Serro, 394 indivíduos (67,81%) foram negativos considerando o ponto de corte de $\geq 90\%$ e, portanto, estariam susceptíveis a uma infecção pelo YFV. E para o ponto de corte de $\geq 50\%$, 150 indivíduos (25,8%) seriam soronegativos.

Considerando o ponto de corte de 90%, o qual aumenta a especificidade da técnica e limita possível reatividade cruzada entre os flavivírus, quase 70% da população analisada não apresentava anticorpos neutralizantes contra o YFV no momento da coleta mesmo com um surto vigente de FA, que atingiu fortemente Minas Gerais. A interpretação sumária deste dado sugere um possível déficit na vacinação do município do Serro, além da possível queda do título de anticorpos neutralizantes ao longo do tempo pós vacinação, fatos que poderiam favorecer a emergência de novos casos. No entanto, este dado precisa ser analisado com cautela e discutido à luz da cobertura vacinal declarada, das estratégias de vacinação utilizadas, considerando a resposta imune humoral e celular desencadeada pela vacina 17DD e até mesmo do significado do resultado de um teste sorológico feito *in vitro*.

Sabe-se que a soroneutralização não é capaz de distinguir entre anticorpos gerados por uma infecção natural ou por vacinação (MACHADO *et al.*, 2013). No entanto, levando em consideração a alta taxa de cobertura vacinal no Serro (98,32%) e a ausência de infecção pregressa na população amostrada, acredita-se que a grande maioria da população apresente anticorpos devido à exposição vacinal. Contudo também é interessante ressaltar que segundo Vasconcelos (2003), grande parte dos casos de Febre Amarela são assintomáticos, em torno de 40-65% dos casos.

Porém, dando destaque para o elevado número de indivíduos susceptíveis encontrados na população do Serro, fatores que poderiam ser atribuídos a ausência de anticorpos neutralizantes são a falha na soroconversão ou a redução do título de

anticorpos neutralizantes com os anos pós vacinação. A taxa de soroconversão das vacinas 17D e 17DD varia de 89,7-98,2% para adultos e de 67-94% em crianças, mas alguns fatores podem interferir na soroconversão como estocagem inadequada, imunossenescência, imunossupressão, proteção cruzada contra outros flavivírus, gravidez e desnutrição severa (BELMUSTO-WOR *et al.*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017; FERREIRA *et al.*, 2018).

Considerando a queda no nível de anticorpos neutralizantes decorrida a primeira vacinação contra a FA, estudos comprovam que os níveis de anticorpos neutralizantes podem diminuir significativamente em anos subsequentes a vacinação contra FA, e assim a proteção induzida pela vacina poderia não ser mais efetiva (CALDAS *et al.*, 2014; CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2016).

Também são fatores que podem contribuir para o aumento de indivíduos susceptíveis nas populações de risco, a reduzida imunização de trabalhadores rurais que vivem próximos a áreas de mata, que, portanto, estariam mais expostos à doença; o foco das campanhas de vacinação direcionado principalmente para crianças, quando na realidade devem-se englobar também adultos em idade economicamente ativa, os quais geralmente são a faixa etária mais acometida. Além disso, deve-se ressaltar a possível dificuldade de adesão à vacinação por parte de alguns indivíduos devido à preocupação com possíveis efeitos adversos (POSSAS *et al.*, 2018).

São limitações do estudo a presença de reatividade cruzada entre os flavivírus, o que pode dificultar diagnósticos sorológicos. E diante disso o fato de não ter sido realizada a técnica de soroneutralização para outros flavivírus, como DENV e ZIKV, que também são relevantes no cenário epidemiológico do Brasil (DONALISIO *et al.*, 2017). Além da ausência de dados de histórico vacinal para todos os participantes envolvidos no estudo, e o fato de não ter sido possível realizar um estudo longitudinal dessa população.

Esse estudo contribui para o entendimento da soroprevalência de anticorpos neutralizantes anti-YFV nas populações rural e urbana do município do Serro (MG), e alerta para a possibilidade de populações susceptíveis a FA em áreas com alta cobertura vacinal declarada, o que poderia facilitar a transmissão do YFV, desencadeando um aumento do número de casos humanos e até um início de ciclo urbano da doença.

Em vista disso, nossos resultados reforçam a importância das ações de vigilância epidemiológica e de estudos de soroprevalência no contexto da FA. E ressaltam a importância da elaboração e do monitoramento de estratégias de prevenção, mais especificamente, campanhas de vacinação contra a Febre Amarela.

8. CONCLUSÕES

- Foi constatado através das análises do SINAN que a Febre Amarela atingiu no período de 2001 a 2016 principalmente indivíduos do sexo masculino (84,17%), em idade economicamente ativa. De todos os casos notificados no período, a taxa de óbitos foi de 50,72%.
- O estado com maior número de casos registrados no período analisado foi Minas Gerais, sendo que na região Nordeste não foram notificados casos. Grande parte dos casos de Minas Gerais foram notificados nos anos de 2001, 2003 e 2016, e nesse período o Serro foi o município com maior número de casos.
- Foi observada uma soroprevalência de anticorpos anti-YFV de 75,2% na PRNT₅₀ e de 34,8% na PRNT₉₀ para a população rural do Serro e de 73,5% na PRNT₅₀ e 30,5% na PRNT₉₀ para a população urbana do município.
- Foi observada uma soroprevalência de anticorpos anti-YFV de 72,5% na PRNT₅₀ e de 35,3% na PRNT₉₀ para os pacientes com suspeita clínica de arbovirose provenientes de Diamantina.
- Considerando as populações rural e urbana do Serro, a porcentagem de indivíduos negativos para a presença de anticorpos neutralizantes anti-YFV foi de 67,8% na PRNT₉₀ e de 25,8% na PRNT₅₀.
- Não foram detectados anticorpos neutralizantes anti-YFV em dez indivíduos com histórico vacinal contra FA comprovado.
- De todas as amostras analisadas, 6,3% foram positivas para IgG e 2,5% para IgM por meio de teste rápido imunocromatográfico para Dengue.
- Com relação ao ELISA, para todas as populações 10,9% das amostras foram positivas para DENV-1.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar novos ensaios de soroneutralização das amostras positivas na PRNT₉₀ para outros flavivírus, como DENV e ZIKV.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.A.B. et al. Yellow Fever Outbreak Affecting Alouatta Populations in Southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. **American Journal of Primatology**, 74:68–76, 2012.
- BARBOSA, C.M. et al. Yellow Fever Virus RNA in urine and semen of Convalescent Patient, Brazil. Research letters. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 24, No. 1, January 2018.
- BARNETT, E.D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. **Emerging infections**. vol. 44, 850-856, 2007.
- BARRETT, A. D.T.; HIGGS, S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. **The Annual Review of Entomology**, 52:209–29, 2007.
- BARRETT, A.D.T. Yellow Fever Virus. **Encyclopedia of life sciences**. University of Texas, USA, 2001.
- BARRETT, A.D.T. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. Review, **Vaccine**, 2017.
- BARRETT, A.D.T.; TEUWEN, D.E. Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? **Current Opinion in Immunology**, Elsevier, 21:308–313, 2009.
- BEASLEY, D.W.C.; MCAULEY, A.J.; BENTE, D.A. Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. **Antiviral Research**, vol. 115, 48–70, 2015.
- BELMUSTO-WORN VE, SANCHEZ JL, MCCARTHY K, NICHOLS R, BAUTISTA, CT, MAGIL AJ, et al. Randomized double-blind phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (Arilvax, and YF-Vax) in healthy infants and children in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72:189-197, 2005.
- BOLLET, A.J. Military medicine in the Spanish-American War. **Perspectives in Biology and medicine**. 48, 293–300, 2005.
- BRASIL. Guia para profissionais de Saúde, Febre Amarela. Ministério da Saúde, **Secretaria de atenção à saúde**. 1ª ed., atual. – Brasília, 67p. 2018.
- BRITO, L.B.M. et al. Febre Amarela: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, vol.8, n.3, pp.61-65, 2014.
- BRYANT, J.E. et al. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. **PLoS Pathog**, 3(5): e75. doi:10.1371/journal.ppat.0030075, 2007.

BRYANT, J.E.; BARRETT, A.D.T. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. **Immunology and Medical Microbiology**, vol. 39, 103-118, 2003.

CALDAS, I.R.; Camacho, L.A; Freire, M.S; Torres, C.R; Martins, R.M; Homma, A. et al. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. **Vaccine**, 32 4977–4984, 2014.

CAMPI-AZEVEDO, A.C. et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**.12(2):491-502, 2016.

CARVALHO, A.G.O. Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e descoberta de novos antivirais contra flavivírus. **Universidade Federal de Pernambuco**, UFPE/CCB-2015-106, Recife, 2015.

CDC, Yellow Fever, Clinical & Laboratory Evaluation. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/healthcareproviders/healthcareprovidersclinlabel.html>. Acesso em: 20 de julho de 2017.

CDC. History Timeline Transcript. Yellow Fever: History, Epidemiology, and Vaccination Information lesson. Department of health and human services. **Centers for disease control and prevention**, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/traveltraining/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/HistoryTimelineTranscript.pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

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

CHRISTIAN, K.A. et al. What We Are Watching—Top Global Infectious Disease Threats, 2013-2016: An Update from CDC’s Global Disease Detection Operations Center. **Health Security**, Mary Ann Liebert, Inc., vol. 15, number 5, 2017.

COSTA, Z.G.A. Estudo das características epidemiológicas da Febre Amarela no Brasil, nas áreas fora da Amazônia legal, no período de 1999 a 2003. **Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca**, Brasília, Distrito Federal, 2005.

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

COSTA, G.B. et al. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. **Virology Journal**, 13:121. DOI 10.1186/s12985-016-0575-6, 2016.

COUTO-LIMA, D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Scientific Reports**, 7: 4848, DOI: 10.1038/s41598-017-05186-3, 2017.

DOMINGO, C. et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory. **Emerging Microbes & Infections**, 7:129, 2018.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R.; ZUBEN, A.P.B.V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, 51:30, 2017.

DOUAM, F; PLOSS, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. **Cell Press, Trends in Microbiology**, vol. 26, Issue 11, p.913-928, november, 2018.

DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **PNAS**, vol. 112, no. 47, november, 2015.

DOWD KA, PIERSON TC. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. **Virology**; 411(2):306–15, 2011.

ECKERT, J. In the days of the epidemic: The 1793 yellow fever outbreak in Philadelphia as seen by physicians. **Trans Stud. Coll. Phys.** Phila. 15, 31–38, 1993.

ENGELMANN, F. et al. Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3295, 2014.

ESTOFOLETE, C.F.; NOGUEIRA, M.L. Is a dose of 17D vaccine in the current context of Yellow Fever enough? **Brazilian Journal of Microbiology**. Jul-Sep; 49(3): 683–684, 2018.

ESTRADA, A. et al. Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. **Science advances**, review, 2017;3: e1600946, 18 january 2017.

FARIA, N.R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **American Association for the Advancement of Science**, vol 352, April 2016.

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

FERNANDEZ-GARCIA, M.D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**, April, 2009.

FERNÁNDEZ-SANLÉS, A. et al. Functional Information Stored in the Conserved Structural RNA Domains of Flavivirus Genomes. **Frontiers in Microbiology**, vol. 8, article 546, april 2017.

FERREIRA, C.D.C et al. The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. **Expert review of vaccines**. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1406800>, 2018.

FERREIRA, K.V. et al. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.1, p. 40-47, 2011.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. **EcoHealth**, 2018.

GARDNER, C.L.; RYMAN, K.D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clinics in Laboratory Medicine**, vol. 30, p. 237-260, 2010.

GAUNT, M.W. et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, v. 82, 1867–1876, 2001.

GAYDOS, J. et al. Alcohol abuse and smoking alter inflammatory mediator production by pulmonary and systemic immune cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 15;310(6):L507-18, 2016.

GEESSEN KROON, E. et al. Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. **Curr. Protoc. Microbiol**. 42:14A.5.1-14A.5.43, agosto, 2016.

GOTUZZO, E.; YACTAYO, S.; CORDOVA, E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: Systematic review on the need for a booster every 10 years. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 89, 434–444, 2013.

GOULD, E.A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, vol. 371, No. 9611, p500–509, february 2008.

HANLEY, K.A. et al. Fever versus Fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. **Infect. Genet. Evol.** 292–311, october, 2013.

HEINZ, F.X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. Elsevier, **Vaccine**. 30, 4301–4306, 2012.

HEPBURN, M.J et al. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine. **Vaccine**, 24, 2843–2849, 2006.

IEF. Cobertura Vegetal de Minas Gerais. **Instituto Estadual de Florestas**, 2018. Disponível em: <http://www.ief.mg.gov.br/florestas> Acesso em: 06 de janeiro de 2019.

IBF. Bioma Mata Atlântica. **Instituto Brasileiro de Florestas**, 2018. Disponível em: <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>. Acesso em: 09 de janeiro de 2019.

IBGE. Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2016. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Diretoria de Pesquisas, DPE. Coordenação de População e Indicadores Sociais, COPIS, 2016.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2016. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 23 de junho de 2017.

JENTES, E.S et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. **Lancet Infect Dis**. vol.11: 622–32, 2011.

JOHNSON, B.W. et al. Evaluation of Chimeric Japanese Encephalitis and Dengue Viruses for Use in Diagnostic Plaque Reduction Neutralization Tests. **Clinical and vaccine immunology**, p. 1052–1059, July 2009.

JONKER EFF, VISSER LG, ROUKENS AH. Advances and controversies in yellow fever vaccination. **Ther Adv Vaccines**. 2013; 1: 144–152.

JULANDER, J.G. Experimental therapies for yellow fever. **Antiviral Research**, Elsevier, 97, 169–179, 2013.

KLITTING, R. et al. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? **Genes**, 9, 291; doi: 10.3390/genes9060291, 2018.

LEPINIEC, L. et al. Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. **Journal of General Virology**, 75, 417423, 1994.

LI, G. et al. Memory T Cells in Flavivirus Vaccination. **Vaccines**, 6, 73; doi: 10.3390/vaccines6040073, 2018.

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

MACHADO, V.W. et al. Serologic assessment of yellow fever immunity in the rural population of a yellow fever-endemic area in Central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46(2):166-171, 2013.

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

MANSFIELD, K.L. et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **Journal of General Virology**, 92, 2821–2829, 2011.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. COES – Febre Amarela, Informe, nº 43/2017. Centro de operações de emergências em saúde pública sobre febre amarela. **Ministério da Saúde**, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. **Ministério da Saúde**, 2ª ed. Brasília, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. Volume único, Brasília, 812 p. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Ministério da Saúde**, Brasil, 2014.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil, 2018/2019. Informe nº01, **Ministério da Saúde**. CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualização: 08/11/2018.

MIYAJI, K.T. et al. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 59: e2, 2017.

MONATH, T. P. Yellow fever. *Viral tropical infections*. **The Medicine Publishing Company**, 33:7, 2005.

MONATH, T.P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. **Expert Rev. Vaccines**, 11(4), 427–448, 2012.

MONATH, T.P. Yellow fever: an update. **The Lancet**, Infectious Diseases, vol 1, August, 2001.

MONATH, T.P.; VASCONCELOS, P.F.C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, vol. 64, 160–173, 2015.

MOURA, L.C. et al. Dengue na região do Alto do Jequitinhonha: análise das notificações. **Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas**. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Reg.: 120.2.095, UFVJM, 2011.

MUTEBI, J.P. et al. Phylogenetic and Evolutionary Relationships among Yellow Fever Virus Isolates in Africa. **Journal of Virology**, vol. 75, no. 15, p. 6999–7008, Aug, 2001.

MUTEBI, J.P.; BARRETT, A.D.T. The epidemiology of yellow fever in Africa. **Microbes and Infection**, vol.4, 1459–1468, 2002.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Alcohol alert. **U.S. Department of Health & Human Services**, n. 71, january 2007.

NIEDRIG, M. et al. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. **Trop Med Int Health**, 4:867-871, 1999.

NUNES, M. R. T. et al. Genomic and Phylogenetic Characterization of Brazilian Yellow Fever Virus Strains. **Journal of Virology**, vol. 86 number 24, p. 13263–13271, december 2012.

OLIVEIRA-FILHO, E.F. et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. **Transbound Emerg Dis**. 1–4, 2018.

OMS. Diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus da Febre Amarela. **Organização Mundial da Saúde**, Fev, 2017.

OMS. Diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus da Febre Amarela. **Organização Mundial da Saúde**. Escritório regional para as Américas, fevereiro de 2017.

OMS. Febre amarela, ficha descritiva. **Organização Mundial de Saúde**, 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/pt/>>. Acesso em: 10 de julho de 2017.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Y.; PATIÑO-BARBOSA, A.M.; RODRIGUEZ-MORALES, A.J. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. **F1000Research**, 6:398, 2017.

PAHO. Yellow fever: number of confirmed cases and deaths by country in the Americas, 1960-2015. Health emergency information & risk assesment unit (HIM), Health Emergencies Department (PHE), **Pan American Health Organization**, 2016. Disponível em: http://ais.paho.org/hip/viz/ed_yellowfever.asp. Acesso em: 14 de dezembro de 2018.

PAHO. About Yellow Fever Vaccine. **Pan American Health Organization**, 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9838&Itemid=41069&lang=en. Acesso em: 15 de julho de 2017.

PAHO. Control of Yellow Fever, Field Guide. Washington. **Pan American Health Organization**, Scientific and Technical Publication, no. 603, 2005.

PAHO. Yellow Fever. **Pan American Health Organization**. World health day, 2014. Disponível em: <<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/04/Yellow-fever.pdf>> Acesso em: 13 de julho de 2017.

PAHO. Brazil launches world's largest campaign with fractional-dose yellow fever vaccine. **Pan American Health Organization**, 2018. Available online: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14065&Itemid=135&lang=en. 20, fev, 2018. Acesso em: 14/08/2018.

PAULES, C.I.; FAUCI, A.S. Yellow Fever — Once Again on the Radar Screen in the Americas. **The New England Journal of Medicine**, perspective, 376;15, april, 2017.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flavivirus in Equines of the Pantanal, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

PIERSON, T.C et al. Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development. Elsevier Inc, **Cell Host & Microbe**, 4, September 11, 2008.

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

POSSAS, C. et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 113(10): e180278, 2018.

PULENDRAN B, Oh JZ, NAKAYA HI, et al. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. **Immunol Rev**. 2013;255(1):243–255.

PULENDRAN, B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. **Nature reviews Immunology**, volume 9, october, 2009.

QUARESMA, J.A.S et al. Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-h, TNF-a and NK cells activity. **Virology**, vol. 345, 22 – 30, 2006.

QUARESMA, J.A.S. et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Rev. Med. Virol**. 23, 305–318, 2013.

REZENDE, I.M. et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 12 (6): e0006538, 2018.

RIBEIRO, M. et al. Febre amarela: estudo de um surto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(5):523-531, set-out, 2009.

ROMANO, A.P.M et al. Yellow Fever in Brazil: Recommendations for Surveillance, Prevention and Control. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 20(1):101-106, jan-mar, 2011.

ROMANOS, M.T.V.; CAVALCANTI, J.F. Febre Amarela e Dengue. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Virologia Humana**, 3ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2015.

SES/MG. Manejo Clínico Febre Amarela. Governo do Estado de Minas Gerais, **Secretaria de Estado de saúde de Minas Gerais**, 2017.

SES/MG. Boletim epidemiológico especial. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. **Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais**. Data da publicação: 18/10/2018.

SES/MG. Dados de Cobertura Vacinal em Minas Gerais. **Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais**. Atualização em 19/11/2018. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/febreamarela>. Acesso em: 26 de janeiro de 2019.

SES/MG. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika. **Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais**. Nº 116, data da publicação: 10/12/2018.

SHEARER, F.M et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. **The Lancet**, Infectious Diseases, vol. 17, issue 11, P1209-1217, november 01, 2017.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, 98:2–3, 2017.

SMIT, J.M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, vol.3, 160-171, 2011.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Dengue and Other Emerging Flaviviruses. The British Infection Society, **Journal of Infection**. V. 42, 104–115, 2001.

STIASNY, K.; HEINZ, F.X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, 87, 2755–2766, 2006.

STOCK, N.K. et al. Biological and Phylogenetic Characteristics of Yellow Fever Virus Lineages from West Africa. **Journal of Virology**, vol. 87, n.5, p. 2895–2907, march 2013.

SVS. Epidemia de febre amarela silvestre na região da bacia do rio doce – minas gerais. Dezembro de 2002 a março de 2003. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ano 03 - nº 06, 2003.

SVS. Manual de vigilância epidemiológica de Febre Amarela. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2004.

SVS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Boletim epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Ministério da Saúde, vol.50, nº 04, jan 2019.

TER MEULEN, J. et al. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. **J. Infect. Dis.** 190, 1821–1827, 2004.

TOMORI, O. Yellow Fever: The Recurring Plague. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 41(4):391–427, 2004.

TSEGAYE, M. M. et al. Sero-prevalence of yellow fever and related Flavi viruses in Ethiopia: a public health perspective. **BMC Public Health**, 18:1011, 2018.

TUBOI, S. H. et al. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998–2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 101, 169–175, 2007.

VASCONCELOS, P.F. Single shot of 17D vaccine may not confer life-long protection against yellow fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz**;113(2):135–137, 2018.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Artigo de revisão, 36(2):275-293, mar-abr, 2003.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Vol. 5, Nº 2, 2002.

VASCONCELOS, P.F.C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Febres Hemorrágicas Virais, Instituto Evandro Chagas, **Revista de Saúde Pública**, 2010.

VASCONCELOS, P.F.C.; MONATH, P.C. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. **Vector-borne and zoonotic diseases**, short communication, 2016.

WATSON AM, LAM LK, KLIMSTRA WB, et al. The 17D-204 vaccine strain-induced protection against virulent yellow fever virus is mediated by humoral immunity and CD4+ but not CD8+ T cells. **PLoS Pathog**.12(7), 2016.

WATSON, A.M. et al. The 17D-204 Vaccine Strain-Induced Protection against Virulent Yellow Fever Virus Is Mediated by Humoral Immunity and CD4+ but not CD8+ T Cells. **PLoS Pathog** 12(7): e1005786, 2016.

WATSON, A.M; KLIMSTRA, W.B. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. **Viruses**, 9, 77, 2017.

WHO. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **World Health Organization**. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, 2007.

WHO. Yellow fever laboratory diagnostic testing in Africa. **World Health Organization**, Interim Guidance, julho de 2016.

WHO. Yellow fever. Fact sheet. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>. Acesso em: 14 de julho de 2017.

WHO. A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017-2026. **World Health Organization**, version 1, agosto, 2017.

WHO. Yellow Fever Global annual reported cases and YFV coverage, 1980-2017. Immunization, Vaccines and Biologicals, Yellow Fever. **World Health Organization** novembro, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/yf_coverage_2017.jpg?ua=1>. Acesso em: 06 de janeiro de 2019.

YU, I-MEI. et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, vol 319, 28 march 2008.

ZANOTTO, P.M DE A. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 93, pp. 548-553, January, 1996.

ANEXOS

ANEXO A

Modelo de Questionário epidemiológico aplicado



Projeto: Avaliação de rotas alternativas de transmissão do *Vaccinia virus* em áreas urbanizadas do estado de Minas Gerais, Brasil.

Entrevistador: _____ Data da entrevista: ___/___/___ Número do questionário: _____

SEÇÃO 1 – INFORMAÇÃO GERAL OU DEMOGRÁFICA

1) Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___

2) Sexo: _____

3) Endereço: _____

4) Qual seu nível educacional?

- 0. () Nunca foi a uma escola
- 1. () Ensino fundamental
- 2. () Ensino médio
- 3. () Graduação
- 4. () Pós graduação
- 99. () Ignorado

5) Qual sua profissão? _____

6) Origem étnica (ou Raça). Por favor, especifique sua etnia:

- 0. () Pardo
- 1. () Preto
- 2. () Branco
- 3. () Amarelo
- 4. () Indígena
- 99. () Ignorado

7) Qual é a sua renda familiar?

- 0. () Menos que R\$ 937,00
- 1. () R\$ 937,00 – R\$ 1.874,00
- 2. () R\$ 1.874,00 – R\$ 2.811,00
- 3. () R\$ 2.811,00 – R\$ 3.748,00
- 4. () R\$ 3.748,00 – R\$ 4.685,00
- 5. () Mais que R\$ 4.685,00
- 99. () Ignorado

SEÇÃO 2 – HISTÓRICO SOBRE VACCÍNIA BOVINA

1. Você já ouviu sobre Vaccinia bovina antes?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

2. Como você ouviu sobre Vaccinia bovina?

- 0. Nunca ouvi sobre a doença ()
- 1. Durante um surto ()
- 2. Através de fazendeiros e ordenhadores ()
- 3. Profissionais de saúde ou veterinários ()

4. Rádio ()
 5. TV ()
 6. Jornal local ()
 7. Internet ()
 99. Ignorado ()

3. Você já teve Vaccinia bovina?

0. Não ()
 1. Sim () Local da lesão: _____ Duração das lesões: _____
 99. Ignorado ()

4. Conhece alguém que teve Vaccinia bovina?

0. Não ()
 1. Sim () Local da lesão: _____ Duração das lesões: _____
 99. Ignorado ()

5. Teve contato com algum indivíduo com Vaccinia bovina?

0. Não ()
 1. Sim ()
 99. Ignorado ()

6. Exame clínico para marca vacinal (cicatriz de vacina contra varíola) no braço esquerdo do participante:

0. () Ausência da marca vacinal
 1. () Presença da marca vacinal

7) Recentemente, você teve algum sintoma como: febre, dor de cabeça, dor no corpo, afta oral, linfadenopatia (íngua) algum tipo de lesão?

0. Não ()
 1. Sim () Qual sintoma? _____ Quando? _____
 99. Ignorado ()

SEÇÃO 3 – CONTATO COM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

1. Você tem contato com animais domésticos?

0. Não ()
 1. Sim () - Qual? Cachorro () Gato () Cavalo () Bovino () Caprino ()
 99. Ignorado ()

2. Teve / tem contato com animais apresentando lesões?

0. Não ()
 1. Sim () Quais: _____
 99. Ignorado ()

3. Já viu roedores na sua propriedade?

0. Não ()
 1. Sim () Onde: _____
 99. Ignorado ()

4. Você tem contato com animais silvestres (macacos: micos, saguis)?

0. Não ()
 1. Sim () Quais: _____
 99. Ignorado ()

5. Frequenta ambiente de mata?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

6. Você frequenta propriedades rurais (fazenda)?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

7. Você já viu macacos próximos à sua propriedade?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

8. Foi vacinado contra febre amarela?

- 0. Não ()
- 1. Sim () Quantas vezes? _____ Data da última vacinação: ____/____/____
- 99. Ignorado ()

9. Você já teve febre amarela?

- 0. Não ()
- 1. Sim () Quando? _____
- 99. Ignorado ()

10. Você já teve dengue?

- 0. Não ()
- 1. Sim () Quando? _____
- 99. Ignorado ()

11. Você já teve zika?

- 0. Não ()
- 1. Sim () Quando? _____
- 99. Ignorado ()

SEÇÃO 4 – CONSUMO E MANIPULAÇÃO DE LEITE E DERIVADOS

1. Você faz o consumo de leite?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

2. Qual a origem do leite consumido?

- 0. Não consome ()
- 1. Próprio ()
- 2. Outra propriedade do município ()
- 3. Industrial ()
- 99. Ignorado ()

3. Você consome leite cru?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 2. Às vezes ()
- 99. Ignorado ()

4. Você manipula leite cru para produção de derivados?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 2. Às vezes ()
- 99. Ignorado ()

5. Os derivados são comercializados?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 2. Não se aplica ()
- 99. Ignorado ()

6. Você consome queijo artesanal?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

7. Realiza ordenha?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 99. Ignorado ()

8. Tipo de ordenha?

- 0. Não realiza ()
- 1. Manual ()
- 2. Mecânica ()
- 99. Ignorado ()

9. O leite obtido é distribuído?

- 0. Não ()
- 1. Sim ()
- 2. Não se aplica ()
- 99. Ignorado ()

10. Utiliza algum produto para a limpeza das suas mãos durante a ordenha?

- 0. Não ()
- 1. Sim () Qual: _____ 1. Antes da ordenha () 2. Depois da Ordenha () 3. Antes e depois ()
- 99. Ignorado ()

11. Utiliza algum produto para a limpeza dos tetos durante a ordenha?

- 0. Não ()
- 1. Sim () Qual: _____ 1. Antes da ordenha () 2. Depois da Ordenha () 3. Antes e depois ()
- 99. Ignorado ()

ANEXO B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto: Avaliação de rotas alternativas de transmissão do *Vaccinia virus* em áreas urbanizadas do estado de Minas Gerais, Brasil.

(de acordo com Resolução N°466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012)

Você está sendo convidado pelo nosso grupo a participar de uma pesquisa que tem como finalidade analisar rotas alternativas de transmissão do *Vaccinia virus* (VACV). Pretendemos avaliar práticas que podem vir a facilitar o contato com o VACV. Assim, gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário de um estudo que nos auxiliará a compreender melhor a epidemiologia das infecções por VACV no Brasil, podendo auxiliar no desenvolvimento de medidas de prevenção.

O VACV é o agente causador da vaccínia bovina no Brasil, doença associado à formação de lesões ulcerativas em bovinos e ordenhadores, o que resulta em perdas econômicas e impactos relacionados à saúde pública. Desde 1999, vários casos de vaccínia bovina foram notificados, principalmente no estado de Minas Gerais, e um grande número de amostras de VACV foram isoladas durante esses surtos. O contato direto entre o homem e o animal infectado apresentando lesões no teto durante o manuseio sem uso de proteção, frequentemente resulta na transmissão do vírus para o homem e promove a disseminação do vírus dentro do rebanho, caracterizando essa doença como zoonótica e de caráter ocupacional.

Você está sendo convidado a participar como voluntário. Caso aceite, você responderá a um questionário simples, sobre seus hábitos, incluindo contato com animais domésticos e silvestres; e consumo e manipulação de leite cru e derivados. Além disso, será coletada uma amostra de sangue para detectar se você possui imunidade contra o vírus, no entanto, essa coleta não é obrigatória para a sua participação na pesquisa. Esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Esses são os mesmos efeitos que qualquer exame de sangue pode causar. Também será coletada uma amostra de swab oral e swab de lesão, caso você possua alguma no momento. Todos os testes serão acompanhados por profissional habilitado e medidas para diminuir os problemas citados, como aplicação de gelo após a coleta,

serão realizadas. Serão retirados 5 ml de sangue. Todo material utilizado é descartável ou estéril, portanto, isento de risco de contaminação. Serão utilizadas seringas descartáveis individuais para cada paciente. Todo material utilizado será destruído em frente ao paciente. Todos os exames a serem realizados serão gratuitos e os resultados serão enviados gratuitamente aos pacientes doadores.

Sua participação neste estudo possibilitará o entendimento sobre as práticas que podem vir a facilitar a infecção pelo VACV. Este estudo possibilitará o desenvolvimento de medidas de prevenção contra o VACV.

Para a realização deste projeto, os pesquisadores o submeteram ao Comitê de Ética em Pesquisas (COEP) envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Minas Gerais. O COEP poderá ser contatado em caso de dúvidas éticas no TCLE, basta solicitar uma cópia ao comitê através do seguinte contato: Endereço - Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901 Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005 Telefone: (031) 3409-4592 - E-mail: coep@prpq.ufmg.br.

Você tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo. A pesquisa será realizada no Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade, e em nenhum momento usaremos seu nome. Desta forma, as identidades serão preservadas. Esclarecemos também que ao participar desta pesquisa você poderá não ter nenhum benefício direto, assim como não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Entretanto, esperamos que este estudo nos forneça informações importantes sobre a Vaccinia Bovina, de forma que possamos contribuir para evitar infecções futuras.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

Termo de consentimento livre após esclarecimento

Eu, _____

li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo.

Assim sendo, concordo em participar do estudo.

_____, ____ / ____ / ____

	Nome: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:
Assinatura do voluntário	
Giliane de Souza Trindade Pesquisador responsável	Endereço: Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas / Departamento de Microbiologia / Laboratório de Vírus - Av Antonio Carlos 6627 - Pampulha CEP: 31 270-901 Belo Horizonte MG Brasil Correio eletrônico: giliane@icb.ufmg.br Telefones para contato: (31) 3409-3002

Marca do polegar



ANEXO C - ARTIGO CIÊNTÍFICO PUBLICADO

Vaccine 38 (2020) 6592–6599



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Absence of YF-neutralizing antibodies in vulnerable populations of Brazil: A warning for epidemiological surveillance and the potential risks for future outbreaks



Ana Gabriella Stoffella-Dutra^{a,*}, Jaqueline Silva de Oliveira^a, Galileu Barbosa Costa^b, Erna Geessien Kroon^a, Jônatas Santos Abrahão^a, Angelle Desiree LaBeaud^c, Betânia Paiva Drumond^a, Danilo Bretas de Oliveira^d, Giliane de Souza Trindade^a

^a Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, Brazil

^c Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

^d Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2020

Received in revised form 30 July 2020

Accepted 31 July 2020

Available online 9 August 2020

Keywords:

Yellow fever virus

YF-neutralizing antibodies

Epidemiological surveillance

Serological survey

Public health

ABSTRACT

Yellow Fever (YF) is an acute febrile illness caused by yellow fever virus (YFV), a mosquito-borne flavivirus transmitted to humans and non-human primates. In Brazil, YF is a public health threat and may cause recurrent epidemics, even with the availability of a vaccine. We evaluated the sero-status for YFV in 581 individuals living in a risk area for YF in Brazil. The area presents history of cases and is located in the southeast region of country where outbreaks of YF have been reported since 2016. Through, a PRNT assay, we found 25.8% of individuals lacking YF-neutralizing antibodies. Furthermore, neutralizing antibodies were not detected in 10 individuals with proven vaccination. Our findings reinforce the importance of surveillance systems and the need of an urgent intensification of immunization programs in regions with YFV circulation. Monitoring susceptible individuals that could act as potential disseminators for YFV in risk areas should also be considered.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Yellow fever (YF) is a hemorrhagic fever caused by the yellow fever virus (YFV), an arbovirus (arthropod-borne virus) that belongs to the family Flaviviridae, genus Flavivirus [1,2]. YFV is endemic in tropical regions of African and South American countries, where the virus is maintained in wild transmission cycles involving arboreal vector mosquitoes and non-human primates (NHP) [1,3,4]. In South America, the enzootic cycle involves the vectors of genera *Haemagogus* and *Sabethes*, that accidentally may transmit the virus to humans [1,3,5].

Besides the sylvatic cycle, an urban transmission cycle also occurs, characterized by YFV transmission to humans via the *Aedes aegypti* vector [1,6]. In the urban cycle, humans are the primary

host and factors such as immunological susceptibility, high population density in urban centers, high vector density, and climate conditions may favor the transmission of YFV [6,7,8]. The occurrence of urban cycles highlight the potential for viral spread, and the risk of re-urbanization of the disease [7]. Therefore, the vaccination against YFV is the most effective preventive measure, so the development and distribution of the 17D vaccine in the 1930s has been correlated with a reduction of the disease in endemic areas [4,6,9]. In Brazil, the 17DD vaccine sub-lineage is used since 1937, which may have contributed to the elimination of the YF urban cycle in the country (no urban YF cases have been reported since 1942) [4,10,11]. To reduce the risk of outbreaks and the re-urbanization of YF, as well as guarantee the protection of the population, vaccination coverage must reach the $\geq 95\%$ level recommended by the Brazilian Ministry of Health [12].

In 2016, one of the most significant reported epidemics of sylvatic YF began in Brazil and according to the Ministry of Health, 2,115 human cases were confirmed from July 2016 to June 2018 [13]. The outbreaks were mainly concentrated in the states of Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo, regions of southeastern Brazil that historically had low circulation of YFV

* Corresponding author at: Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: anagstoffella@gmail.com (A.G. Stoffella-Dutra), giliane@icb.ufmg.br (G. de Souza Trindade).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.077>

0264-410X/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

in recent years [8,13]. During YFV re-emergence, an expansion in the viral circulation area has been observed. YFV has moved from the Brazilian Amazon, spreading throughout the Cerrado biome, and reaching areas of the Atlantic Forest, which has a high diversity of NHP species and sylvatic vectors [7,11]. Additionally, the south-east region is located within the Atlantic Forest biome, concentrating the most populous urban centers in the country, and several municipalities from this region had low medium vaccination coverage by the time the 2016 outbreak started [7,13,14,15].

Epidemics of YF are a burden for public health and economy, and moreover YFV presents a high potential for dispersion. Therefore, this disease should be considered a potential threat and be actively monitored [8,16,17]. In Brazil, there are few seroprevalence data for YF, and this lack of knowledge represents a gap in understanding the burden of at-risk populations in the country. Seroepidemiological studies contribute to enhance public health actions and strategies that aim to control viral dispersion and to reduce the occurrence of new epidemics in risk areas. Taking into account the re-emergence of YF in the Southeast Brazil and the need of vaccination in risk areas, this study aimed to evaluate the sero-status for YFV in a population located in an area with proven viral circulation.

2. Material and methods

2.1. Study area

This study was carried out in Serro city (18° 36' 17" S 43° 22' 46" W), north-central region of Minas Gerais State, Brazil. Serro city has a population of 20,835 inhabitants, of which 12,895 are urban residents [18]. The local economy is mainly based on agricultural and dairy activities. The area has vegetation covered by Cerrado and Atlantic Forest, with extensive fragmented or mosaic areas due to anthropic action [19–21] (Supplementary Fig. 1).

2.2. Population and study measures

This cross-sectional study was conducted on a random sample of individuals from the urban area of Serro during 2015, 2017, and 2018. Individuals from all neighborhoods were enrolled. Participation in the study was voluntary, no exclusion criteria were used, and individuals of all age groups were enrolled. We additionally included the rural population of Serro sampled during 2012–2013 [22].

For both populations, urban and rural, a semi-structured and pre-coded questionnaire was applied to elicit demographic data. Demographic data included age, gender, self-reported race/ethnicity, occupation, income, and educational level. For samples collected during the YF outbreaks (2017 and 2018), YF exposure/risk factors for the presence of YF-neutralizing antibodies questions were also collected. These factors focused on behavioral habits such as access to forest areas and rural properties, the presence of NHP near to the household, history of vaccination against YF, and past infection with YFV, dengue virus, and Zika virus.

The sample size for the urban population was calculated by using Open-Epi version 3.01 (<https://www.openepi.com>), using an expected prevalence of 50%, alpha error of 5%, accuracy of 10% around the estimate and design effect of 1.0.

2.3. Plaque reduction neutralization test

Serum samples were collected from each participant and stored at -20°C . To assess the presence of YF-neutralizing antibodies we used a plaque reduction seroneutralization test (PRNT), considered the gold standard for the differential diagnosis of flavivirus

infections [23–26]. Initially, the sera were heated at 56°C for 30 min to denature the complement system proteins. Samples were then diluted in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO®, USA) free of fetal bovine sera (FBS) in a proportion of 1:20. Diluted samples were added to a solution (1:1) containing approximately 150 plaque-forming units (PFU) of YFV 17DD (lot 980FPO662). The final solution was homogenized and incubated for 1 h at 37°C , in a 5% CO_2 atmosphere. Six-well plates containing VERO cells (ATCC no. CCL-81) monolayers (80% confluence) were inoculated with virus/serum solutions, and incubated at 37°C for 1 h in 5% of CO_2 atmosphere. Two ml of semi-solid medium (Carboxymethyl cellulose 1% (SYNTH®, Brazil) and 199 2X Medium (CULTILAB, Brazil) with 2% FBS) was added to each well, cell monolayers were incubated for 5 days at 37°C in 5% of CO_2 atmosphere. Vero monolayers were fixed with formalin (10%) (SYNTH®, Brazil) and stained with crystal violet solution (1%) (SYNTH®, Brazil). Each six-well plate included one well reserved for cell control, and all samples were tested in duplicate. A sample was considered positive when the average number of PFUs was lower than half of the PFUs counted in the virus control (at least a 50% reduction in PFUs). The virus control, also known as the negative serum control, was made by using only FBS instead of sera; and submitted to the same protocol.

2.4. Statistical analysis

A descriptive analysis of the results was carried out and comparisons between those participants with and without neutralizing antibodies against YFV using a 2-tailed Fisher's exact test with significance level of 5% ($p \leq 0.05$) by using EPI-INFO software version 7.2 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>). Odds relative and confidence intervals of 95% were also calculated. All those variables that showed a significance level of 5% in the univariate analysis were tested again in a multiple logistic regression model.

2.5. Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under the registration protocols FR-413704 and 1.974.249, CAAE-65332216.9. 0000.5149. Informed consent was obtained from all participants. In the case of minors, consent was signed by parents or guardians.

3. Results

3.1. Demographic profile of the study population

A total of 581 individuals were enrolled in this study. Women represented 51.5% of total participants whereas men were 48.5%. The average age of respondents were 38.4 years (ranging from 5 to 94 years), and the majority of them (62.0%) self-reported mixed skin color.

In the urban area, 363 individuals were included, being 54.0% women, the average age of participants was 40.9 years (ranging from 9 to 94 years). Most individuals 63.0% self-reported mixed skin color, 52.0% had completed elementary school, and 38.8% reported received between one and two minimum wages. The most common occupations were general service providers (25.0%) and rural workers (8.8%) (Table 1).

In the rural area, 218 participants were included, being most of them men (52.8%). The median age was 38 years (ranging from 5 to 90 years). Of these, 60.0% self-reported mixed skin color. The majority of participants (74.3%) reported a monthly family income of minimum wage or less, and completed only elementary school (63.7%). The most common reported occupations were rural workers (52.3%) and housewives (25.6%) (Table 2).

Table 1
Demographic characteristics of the 363 surveyed individuals from urban area of Serro city, 2015–2018.

Demographics	N (%) ^a	PRNT ₅₀ pos. (%)	PRNT ₅₀ neg. (%)	P value	OR (95% CI)
Gender					
Female	196 (54,0)	141 (52,8)	55 (57,3)	0.5	1.2 (0.7–1.9)
Male	167 (46,0)	126 (47,2)	41 (42,7)		
Age (years)					
5–11	13 (3,6)	4 (31,0)	9 (69,0)	Reference	
12–18	43 (11,8)	32 (74,4)	11 (25,6)	0.007	6.5 (1.7–25.5)
≥19	307 (84,6)	231 (75,2)	76 (24,8)	0.001	6.8 (2.1–22.8)
Self-reported skin color					
Mixed	232 (64,1)	169 (63,5)	63 (65,6)	Reference	
Black	63 (17,4)	48 (18,0)	15 (15,6)	0.6	0.8 (0.4–1.6)
White	67 (18,5)	49 (18,4)	18 (18,8)	1.0	1.0 (0.5–1.9)
Education					
Have never gone to school	17 (4,7)	12 (4,5)	5 (5,2)	Reference	
Elementary school or less	188 (52,1)	137 (51,5)	51 (53,7)	0.8	1.1 (0.3–3.2)
High school	127 (35,2)	95 (35,7)	32 (33,7)	0.7	1.2 (0.3–3.7)
Higher (college)	29 (8,0)	22 (8,3)	7 (7,4)	0.7	1.3 (0.3–5.1)
Income					
≤ 1 min wage	90 (30,8)	63 (70,0)	27 (30,0)	0.4	0.7 (0.4–1.3)
> 1 min wage	202 (69,2)	152 (75,3)	50 (24,7)		
Occupation					
Rural worker	30 (8,5)	26 (86,7)	4 (13,3)	Reference	
Housewives	67 (18,9)	47 (70,1)	20 (29,9)	0.08	2.7 (0.9–10.2)
Students	56 (15,8)	36 (64,3)	20 (35,7)	0.02	0.3 (0.07–0.9)
Healthcare	20 (5,6)	17 (85,0)	3 (15,0)	<0.001	0.03 (0.005–0.14)
Others [†]	181 (51,1)	113 (73,5)	48 (26,5)	0.06	2.7 (0.9–9.6)

Income value in Brazilian currency in 2018 = R\$ 954.00 (US\$ 1.00 = R\$ 4.09 approximately).

^a Calculated by using T-test

[†] Totals may not add up to 100% due to missing data

[†] Others: Lawyer, Announcer, Banking, Notary, Engineer, Businesswoman, Civil Servant, Social Worker, Musician, Teacher and Artist.

Table 2
Characteristics of the 218 surveyed individuals from rural areas of Serro city, 2012–2013.

Variables	N (%) ^a	PRNT ₅₀ pos. (%)	PRNT ₅₀ neg. (%)	P value	OR (95% CI)
Gender					
Female	103 (47,2)	74 (45,1)	29 (53,7)	0.3	1.4 (0.7–2.6)
Male	115 (52,8)	90 (54,9)	25 (46,3)		
Age (years)					
5–11	17 (7,8)	1 (5,9)	16 (94,1)	Reference	
12–18	17 (7,8)	17 (100,0)	0	1	1 (0.06–17.4)
≥19	184 (84,4)	146 (79,3)	38 (20,7)	0.1	0.2 (0.03–1.9)
Self-reported skin color					
Mixed	131 (60,1)	101 (61,6)	30 (55,5)	Reference	
Black	52 (23,8)	43 (26,2)	9 (16,7)	0.4	0.7 (0.3–1.6)
White	35 (16,1)	20 (12,2)	15 (27,8)	0.02	0.4 (0.2–0.9)
Education					
Have never gone to school	22 (10,1)	20 (12,2)	2 (3,7)	Reference	
Elementary school or less	139 (63,8)	103 (62,8)	36 (66,7)	0.08	3.4 (0.9–23.0)
High school or more	57 (26,1)	41 (25,0)	16 (29,6)	0.07	3.8 (0.9–26.9)
Income					
≤ 1 min wage	162 (74,3)	129 (79,6)	33 (20,4)	1.0	0.8 (0.2–2.9)
> 1 min wage	17 (7,8)	14 (82,3)	3 (17,7)		
Occupation					
Rural worker	114 (52,3)	19 (16,7)	95 (83,3)	Reference	
Housewives	56 (25,7)	14 (25,0)	42 (75,0)	0.2	0.6 (0.2–1.3)
Students	32 (14,7)	16 (50,0)	16 (50,0)	0.0002	0.2 (0.08–0.4)
Others [†]	16 (7,3)	5 (31,2)	11 (68,8)	0.2	0.4 (0.1–1.5)
Contact with wildlife					
Yes	107 (49,1)	34 (63,0)	73 (44,5)	0.02	2.1 (1.1–4.0)
No	111 (50,9)	20 (37,0)	91 (55,5)		

Income value in Brazilian currency in 2013 = R\$ 678.00 (US\$ 1.00 = R\$ 4.09 approximately).

^a Calculated by using T-test

[†] Totals may not add up to 100% due to missing data

[†] Others: Bricklayer, driver, civil servant and zootechnist.

3.2. Prevalence of YF-neutralizing antibodies

YF-neutralizing antibodies were detected in 431 individuals, representing an overall prevalence rate of 74.2% (CI95%=67.4–

81.4). In the rural population, 164 individuals had YF-neutralizing antibodies, prevalence rate of 75.2% (CI95%=64.4–87.4), while the overall prevalence rate in the urban population was 73.5% (CI95%=65.0–82.9). The prevalence varied by year

among the urban population, 76.9% in 2015, 68.5% in 2017, and 83.16% in 2018 (Supplementary figure 2).

3.3. Individuals susceptible to YFV infection according to the absence of neutralizing antibodies

Fig. 1 displays the distribution of individuals presenting or not YF-neutralizing antibodies. Considering both rural and urban populations, a total of 25.8% individuals had no detectable neutralizing antibodies against YFV ($n = 150/581$). A total of 54 individuals from rural area (24.8%) were seronegative for YF-specific neutralizing antibodies. The average age of seronegative individuals was 27.9 years, and 66% of these individuals ($n = 36$) fell into the risk group for YFV infection (19–59 years old). In the urban population, 26.5% of the individuals did not show neutralizing antibodies ($n = 96$). The average age of the seronegative individuals was 39 years, and 58% ($n = 56$) of these individuals belonged to the risk group for YFV infection (19–59 years old).

For the urban population inserted in the YF epidemic period (2017–2018), no individual reported a proven history of YF or Zika, although 0.96% ($n = 3$) reported prior infection with DENV. At the time of collection, none of the participants from the two populations declared clinical alterations.

Considering the two populations, 30 children (5–11 years old) were included in the study, in which 13 from the urban area and 17 were from the rural area. Anti-YF neutralizing antibodies were detected in four children from the urban area, while only one from the rural area had positive serology.

A total of 297 of participants (95.6%) sampled during 2017–2018 reported a history of vaccination against YF. However, only 52 (16.8%) participants validated this information through a

vaccination card, and 59.6% ($n = 31$) has received one dose of YFV-17DD vaccine, 38.5% ($n = 20$) two doses and 1.9% ($n = 1$) three doses. Of those with validated vaccination cards, 10 individuals (19.2%) did not have detectable YF-neutralizing antibodies. This group consisted of four men and six women, of which the age range varied from 9 years to 62 years. It should be noted, a 18 years old male that tested negative for the presence of neutralizing antibodies and without history of comorbidities had three vaccine doses registered on his vaccination card. Additional information is presented in Table 3. A study population flowchart by collection area and by year is provided in the Supplementary Material.

3.4. Potential risk factors significantly linked to YFV seroprevalence

Potential risk factors related to the YFV exposure are shown in Table 4. For the urban population, only occupation was associated with the presence of YF-neutralizing antibodies (Table 1). Students and healthcare workers were less likely to present antibodies compared to rural workers ($p = 0.02$, OR = 0.3, 95%CI = 0.07–0.9, and $p < 0.001$, OR = 0.03, 95%CI = 0.005–0.14, respectively).

For the urban population, teenagers (12–18 years) and adults (≥ 19 years) were more likely to present YF-neutralizing antibodies compared to children (5–11 years) ($p = 0.007$, OR = 6.5, 95%CI = 1.7–25.5 and $p = 0.001$, OR = 6.8, 95%CI = 2.1–22.8, respectively). Individuals who self-declared white skin color were less likely to present antibodies than individuals who self-reported mixed skin color ($p = 0.02$, OR = 0.4, 95%CI = 0.2–0.9). Moreover, students from rural areas were also less likely to present antibodies compared to rural workers ($p = 0.0002$, OR = 0.2, 95%CI = 0.08–0.4). On the other hand, individuals who reported having contact with wild environment were more likely to present YF-neutralizing antibodies

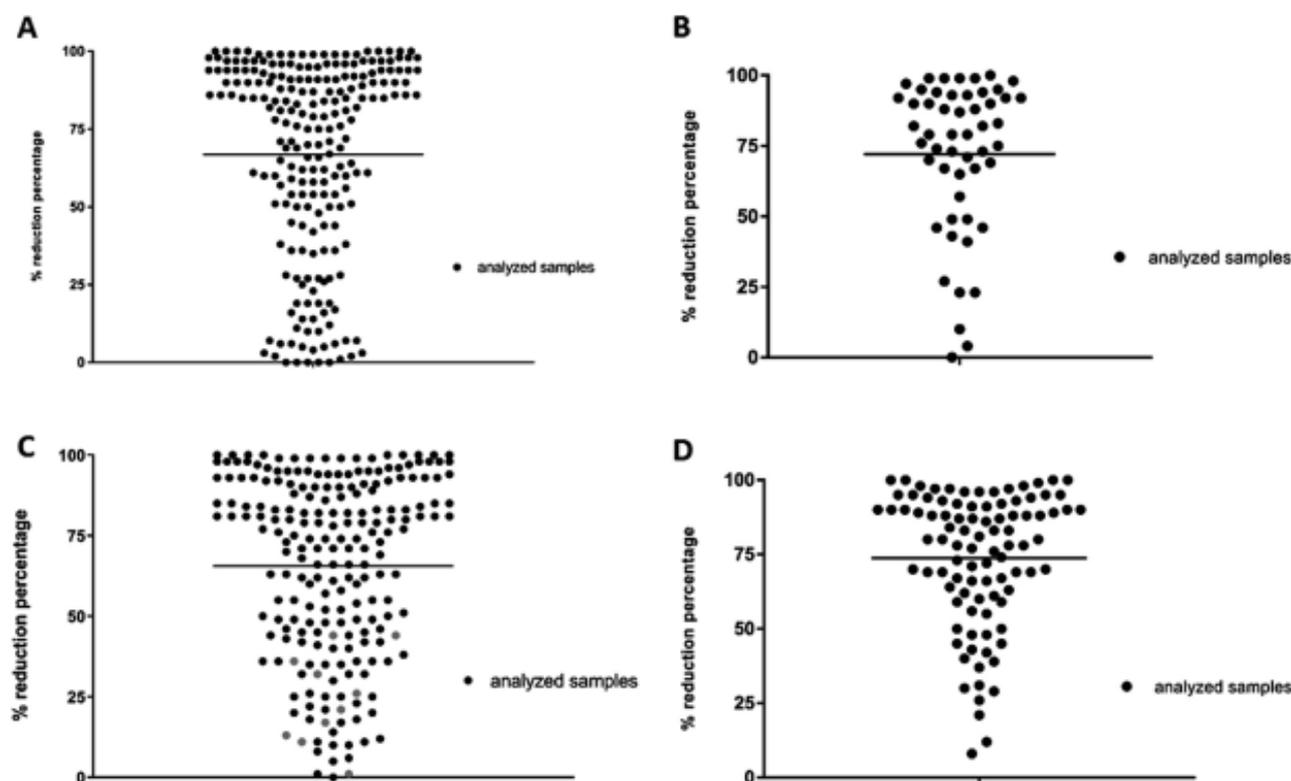


Fig. 1. Scatter plot of percentage reduction of serum samples in relation to virus control. Yellow Fever neutralizing antibodies measured by 50% Plate Reduction Neutralization Test (PRNT). The highlighted line represents an average reduction percentage of all samples. A: Rural Population (2012–2013, $n = 218$); B: Urban Population (2015, $n = 52$); and C: Urban Population (2017, $n = 216$). The red dots are the 10 individuals with validated vaccination cards that did not have detectable neutralizing antibodies. D: Urban Population, (2018, $n = 95$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3

Participants that had proven YFV vaccination history through vaccination cards and did not show detectable YF-neutralizing antibodies.

Serro area	Collection year	Sample number	Sex	Age	Chronic disease	YF vaccination record dates	PRNT ₅₀
Urban	2017	9	F	51	diabetes and bronchitis	2003–2013	negative
Urban	2017	38	M	9	no	2009–2015	negative
Urban	2017	65	M	62	no	2001	negative
Urban	2017	87	F	15	no	2003	negative
Urban	2017	90	F	12	no	2006	negative
Urban	2017	91	M	10	no	2009–2016	negative
Urban	2017	92	M	18	no	2001 – 2003 – 2011	negative
Urban	2017	108	F	10	no	2008	negative
Urban	2017	113	F	29	no	2003–2015	negative
Urban	2017	117	F	17	no	2001	negative

Table 4

Exposure factors to Yellow Fever virus assessed in 363 surveyed individuals from urban areas of Serro city, 2015–2018.

Exposure factors	N (%) ^a	PRNT ₅₀ pos. (%)	PRNT ₅₀ neg. (%)	P value	OR (95% CI)
Have you visited forest areas?					
Yes	178 (57.2)	134 (43.1)	44 (14.2)	0.3	1.3 (0.8–2.1)
No	131 (42.2)	92 (29.6)	39 (12.5)		
Have you visited rural areas?					
Yes	197 (63.4)	146 (47.0)	51 (16.4)	0.6	1.1 (0.75–1.9)
No	113 (36.3)	81 (26.0)	32 (10.3)		
There were any primates near to the locations you visited?					
Yes	101 (32.5)	75 (24.1)	26 (8.3)	0.7	1.1 (0.6–1.9)
No	200 (64.3)	145 (46.6)	55 (17.7)		
Have you received YF vaccine?					
Yes	297 (95.6)	220 (70.7)	77 (24.7)	0.3	2.1 (0.4–10.5)
No	7 (2.2)	4 (1.3)	3 (1.0)		
How many doses of the YF vaccine did you receive?					
1	62 (20.9)	44 (14.8)	18 (6.1)	Reference	
2	125 (42.1)	91 (30.6)	34 (11.4)	0.8	0.9 (0.4–1.8)
3	14 (4.7)	11 (3.7)	3 (1.0)	0.6	0.7 (0.13–2.6)

^a Totals may not add up to 100% due to missing data.

compared to those individuals that had no contact with wild environments ($p = 0.02$, $OR = 2.1$, $95\%CI = 1.1–4.0$).

In the multivariate logistic regression model, variables independently associated with neutralizing antibodies were age and contact with wild environment. Older individuals were 5% more likely to present neutralizing antibodies compared to younger individuals ($OR = 1.05$; $CI\ 95\% = 1.03–1.07$). Furthermore, those individuals who reported to have contact with the wild environment were 2.5 more likely to present neutralizing antibodies ($OR = 2.5$, $95\%CI\ 1.2–5.2$) than those who did not have contact with wild environment.

4. Discussion

Significant events of YF re-emergence in southeastern Brazil during 2016–2018 signal that YFV is no longer limited to forest areas and/or Amazon region, but instead that transmission in the enzootic cycle is occurring near and within large urban centers [7,13,27]. The viral spread close to large unvaccinated populations and also individuals who failed to seroconvert shows that the YF burden could be underestimated. The current scenario of YF epidemics reflects the growing concern about re-urbanization of YF [4,7,8].

Here, we demonstrated that a quarter of the population from both the rural and urban areas of Serro city, located at the epicenter of the recent YF epidemic period, showed no protective immunity against YFV. Until 2002, no evidence of YFV circulation was reported in Serro micro-region [20]. However, from December 2002 to march 2003 an YF outbreak was reported, in which Serro recorded 40% of confirmed cases [20,28].

Since the beginning of YF outbreaks in Brazil, vaccination campaigns were intensified, mainly in the southeast region, the

epicenter of the outbreaks, that reported thousands of human cases [13,27]. However, the estimated number of unvaccinated individuals remains high in Minas Gerais state (2,726,228 million) and the recent overall vaccination coverage is only 92.7% [29]. In recent years (during 2007–2019), accumulated vaccination coverage in Serro has improved from 84.3% to 98.7% [30]. Our data showed that similar proportions of urban and rural population are protected from YFV. Importantly, the seroprevalence rates fall far below the accumulated vaccination coverage for Serro during 2007–2019 and below the target of 95% established by the Ministry of Health.

Our findings also demonstrated that older individuals were more likely to present YF-neutralizing antibodies. This result could be linked to the fact that these individuals may have received more doses of the 17DD vaccine throughout their lives compared to younger individuals. These data could in part explain the wild outbreak patterns, where the vast majority of cases are observed in male patients, young adults of economically active age who may not have been vaccinated [13].

Rural workers were more likely to have antibodies than other categories related to occupation, which could be explained by the fact that they were more exposed in the rural and probably wild environments where wild viruses circulate naturally [7,8]. It's important to note that the estimated percentage of YF asymptomatic cases is around 40–65% [31]. However, this fact can also be related to well established vaccination campaigns to this population that historically is known to be at risk of YF disease [7,32]. Considering what we discussed for the rural workers, as expected, individuals that reported contact with the wild environment were also more likely to present YF-neutralizing antibodies.

We have detected a high proportion of seronegative individuals from both urban and rural areas. These data may indicate that

there may be a deficit in vaccination in the municipality, which could result in a large percentage of the population vulnerable to YFV infection. Indeed, in this study we detected a high percentage of individuals (27%) from urban area that did not show YF-neutralizing antibodies during 2017 and 2018. This data suggests that individuals in urban area were susceptible to YFV infection during an ongoing outbreak in Minas Gerais, which could favor the viral spreading in different urban areas and the emergence of new cases.

In summary, we expected a higher seroprevalence of YFV for both rural and urban populations in Serro, which is located in an area at risk for YF and has intensified the vaccination campaigns against YF during the 2017 epidemic. Although accumulated vaccination coverage in Serro has improved since 2007, the current coverage is still not enough, which warns of the need for better surveillance and vaccination campaigns [14,30].

Teenagers and adults were more likely to present YF-neutralizing antibodies compared to children in urban area. We can attribute this correlation to a bias related to the small size of the children (5–11 years) population sampled ($n = 13$). However, the seroprevalence of 16.7% in children for both populations, can be correlated with the differences in immune response observed with age, where seroconversion rates are generally lower in children.

Previous studies have already shown that the seroconversion rate is generally lower in children, with the 17D and 17DD vaccines varying from 67 to 94%, and 89.7–98.2% for adults. This difference may be related to the immaturity of the immune system, which can contribute to less robust immune responses, the presence of maternal antibodies, and simultaneous infections that can interfere or decrease the immune response [33–36].

Our results highlight the need for booster doses of the 17DD vaccine in Brazilian endemic areas to guarantee long lasting protecting immunity, especially for children living in areas at risk for YF transmission. However, it is important to emphasize that the methods used in this study do not allow us to assess the differences in seroprevalence observed regarding age.

Interestingly, we also found that almost 20% of seronegative individuals had proven YFV vaccination history (10/52) which almost two times more than compared to findings reported by Miyaji and colleagues [37]. The rate of seroconversion for the vaccines 17D and 17DD range from 89.7% to 98.2% in adults and from 67% to 94% in children [33]. Other studies have also reported cases of previously vaccinated individuals who developed natural infection [27,38].

According to the literature, some comorbidities can affect the immune response induced by vaccines [39]. So, in our study, there was only one report of comorbidity, being a 51-year-old woman with diabetes and bronchitis, but this result cannot be conclusive. Nevertheless, these data highlight the susceptibility of a group of previously vaccinated individuals to a disease that exhibits a high mortality rate and has no treatment, and reinforces the recommendation for the adoption of vaccine booster doses in Brazil to avoid risk [40]. In the light of these results, the recommendation of the World Health Organization (WHO) for the adoption of only one dose of the vaccine, especially in endemic areas should be reconsidered [40–45].

The 17DD attenuated vaccine has an efficacy of 90%–98%, but not all vaccinated individuals maintain lifelong protection [4,40]. So, the decline of protective immunity by specific neutralizing antibodies over time is a concern. After primary YFV vaccination, the neutralizing antibody levels may decrease significantly in subsequent years [40,44,45]. Unfortunately, further investigation of this hypothesis could not be performed in this study due to the fact that the individuals included in the study did not provide details for their vaccination history.

Outside of epidemic periods, the adoption of at least three doses of 17DD vaccine at a 10-year interval provide a better induction of long-term immunity [40]. Therefore, our findings reinforce the need for re-vaccination of individuals residing in YF endemic areas, since the absence of YF-neutralizing antibodies can indicate waning immunity over time or even failure of vaccination.

Serro is located in a transition area between the biomes of Cerrado and Atlantic Forest, with considerable anthropic actions mainly due to mining, agricultural, and livestock activities [19,20,46]. Thus, the presence of fragmented forest areas and a large part of the population living in rural areas are risk factors that may be related to the emergence of YF cases [7,21]. However, the risk of urban YFV transmission by the *Aedes aegypti* vector in Serro is currently low (0.4% rate of vector infestation), which is considered satisfactory [47].

Few studies are focused on assessing the seroprevalence of Brazilian populations against YF [37,48]. Besides that, vaccine coverage estimates do not always reflect the reality of immune protection of a population; therefore, seroprevalence studies are useful tools to validate these estimates, especially in poorly epidemiologically monitored regions [49,50]. Through the tracking of populations immunity for vaccination against various diseases, these studies help to alert to the existence of immunization failures and susceptible populations [50].

The YF vaccine is able to induce both a strong activation of the humoral response, with the production of neutralizing antibodies, and the immune cellular response [33,51]. Thus, in addition to antibodies, the cellular response also plays an important role in the protection triggered by the YF vaccine, and both types of immune responses can be used as protective markers [40,45]. However, neutralizing antibodies still remain the main correlate of protection against YFV, being the titer of neutralizing antibodies considered the standard to check for postvaccination immunity. Furthermore, studies with animal model also suggest that neutralizing antibodies are efficient against challenge with virulent strains of YFV [51,40].

In addition, our study highlights a gap between calculated vaccine coverage and immune protection. Failure to report possible YF cases to health agencies may contribute to underestimating the magnitude of epidemics and, consequently, the extent of susceptible individuals residing in areas at high risk for viral transmission.

Our study has limitations. We were unable to establish a longitudinal study with the participants, which could provide more information and help to better monitoring immunity to YF in this population. We were also unable to evaluate cross-reactivity between other flaviviruses. However, there was a low incidence of dengue infections during 2007–2012 in the study area, and only nine cases of dengue fever were reported in Serro according to DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil) [52,53]. Furthermore, data and timing of vaccination for YF were not collected from all participants and, therefore, our data does not allow a more robust analysis of the conditions that lead to the absence of detectable antibodies after a vaccination.

5. Conclusions

In conclusion, we demonstrated that one-quarter of individuals located in areas of high risk for YF in Brazil do not have immunity against YFV and a high proportion of individuals with prior vaccination history still remain at risk with contraction of disease. This data concerns for the possibility of an increasing number of YF human cases in this area at high risk for both the sylvatic and urban cycles of the disease. Our findings emphasize the importance of an active epidemiological surveillance and draws attention for

continued vaccination campaigns aiming $\geq 95\%$ of coverage. Our data also provide useful information that could assist local, national, and international health authorities to develop future vaccination strategies, especially in areas at great risk of viral transmission and with a considerable number of non-vaccinated individuals. Considering that in different regions of Brazil seroprevalence studies aiming to assess whether YFV vaccination coverage really reached levels $\geq 95\%$ are scarce, and we found a seronegativity of 25.8% for rural and urban populations, future YF vaccination campaigns and further specific tests to evaluate immunity in the populations are needed. In summary, we reinforce the importance of seroepidemiological studies which can help direct public health policies to decrease the occurrence of YF epidemics in areas at risk and contain viral dispersion.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) for their excellent technical support. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCTI) grant number 440593/2016-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC), Departamento de Ciência e Tecnologia (DECT), Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (SCTIE), Ministério da Saúde and Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG (PRPq-UFMG). EG Kroon, J S Abrahão, BP Drummond, and GS Trindade are researchers from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.077>.

References

- Barrett ADT, Higgs S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *The Annual Review of Entomology* 2007;52:209–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454>.
- Lindenbach, B.D, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*; 2013.
- Gardner CL, Ryman KD. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med* 2010;30:237–60. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.001>.
- Brasil. Febre Amarela. Guia para profissionais da saúde. Brasília, DF. 1ª edição atualizada, 1ª reimpressão. Secretaria de atenção à saúde, Ministério da Saúde, 2019.
- Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001;1(1):11–20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0).
- WHO. Yellow fever, fact sheets. World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>; 2019. [accessed 07 november 2019].
- Possas, C. et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 113 (10): e180278, 2018. doi: 10.1590/0074-02760180278.
- Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol* 2018;26(11):913–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>.
- Theiler M, Smith HH. Use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med.* 1937;65:787–800. <https://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>.
- Soper FL. Yellow Fever in the Americas, 1938–1942. *Febre Amarela Panam.* 1938;a:1942.
- Silva Natalia Ingrid Oliveira, Sacchetto Lívia, de Rezende Izabela Maurício, Trindade Giliane de Souza, LaBeaud Angelle Desiree, de Thoisy Benoit, Drummond Betânia Paiva. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology* 2020;17(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>.
- Ministério Da Saúde. Monitoramento de Febre Amarela, Brasil, 2019. Informe nº 18, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualização 04/06/2019. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil-n-18.pdf> [accessed 06 march 2020].
- Ministério Da Saúde. Monitoramento do período sazonal da febre amarela Brasil, 2017/2018. Informe nº 27, Ministério da Saúde. CGDT/DEVIT/SVS/MS. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/joutubro/08/Informe-FA.pdf>, 04/10/2018, [accessed 06 march 2020].
- Figueiredo PO, Silva ATS, Oliveira JS, et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. *EcoHealth* 2018;15:864. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1364-z>.
- Romano APM et al. Yellow Fever in Brazil: Recommendations for Surveillance, Prevention and Control. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília* 2011;20(1):101–6. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000100011>.
- Christian Kira A, Juliano A Danielle, Uyeky Timothy M, Mintz Eric D, Nichol Stuart T, Rollin Pierre, Staples J Erin, Arthur Ray R. What We Are Watching—Top Global Infectious Disease Threats, 2013–2016: An Update from CDC's Global Disease Detection Operations Center. *Health Security* 2017;15(5):453–62. <https://doi.org/10.1089/hs.2017.0004>.
- WHO. A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017–2026. World Health Organization, version 1, august, 2017.
- IBGE. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/serro/pesquisa/23/252077> indicador=25199; 2010 [accessed 04 november 2019].
- COSTA, Z.G.A. Estudo das características epidemiológicas da Febre Amarela no Brasil, nas áreas fora da Amazônia legal, no período de 1999 a 2003. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Brasília, Distrito Federal, 2005.
- SVS. Epidemia de febre amarela silvestre na região da bacia do rio doce – minas gerais. Dezembro de 2002 a março de 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ano 03 - nº 06, 2003.
- Amaral CD, Costa GB, de Souza WM, et al. Silent Orthohantavirus Circulation Among Humans and Small Mammals from Central Minas Gerais, Brazil. *EcoHealth* 2018;15:577. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1353-z>.
- Costa GB et al. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPV. *Virology Journal* 2016;13(121). <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0575-6>.
- WHO. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. World Health Organization. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, 2007.
- Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* 2013;195:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetj.2012.08.019>.
- Domingo C et al. Yellow fever in Brazil: the diagnostics laboratory. *Emerging Microbes Infect* 2018;7(129). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0128-8>.
- Barbosa Costa G et al. Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil. *Viruses* 2019;11:1029.
- Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, Xavier J, Quick J, du Plessis L, Dellicour S, Thézé J, Carvalho RDO, Baele G, Wu C-H, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J, Obolski U, Abade L, Vasylyeva TI, Giovanetti M, Yi D, Weiss DJ, Wint GRW, Shearer FM, Funk S, Nikolay B, Fonseca V, Adelino TER, Oliveira MAA, Silva MV F, Sacchetto L, Figueiredo PO, Rezende IM, Mello EM, Said RFC, Santos DA, Ferraz ML, Brito MG, Santana LF, Menezes MT, Brindeiro RM, Tanuri A, dos Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Rocco IM, da Costa AC, Komninakis SCV, Azevedo V, Chieppe AO, Araujo ESM, Mendonça MCL, dos Santos CC, dos Santos CD, Mares-Guia AM, Nogueira RMR, Sequeira PC, Abreu RG, Garcia MHO, Abreu AL, Okumoto O, Kroon EG, de Albuquerque CFC, Lewandowski K, Pullan ST, Carroll M, de Oliveira T, Sabino EC, Souza RP, Suchard MA, Lemey P, Trindade GS, Drummond BP, Filippis AMB, Loman NJ, Cauchemez S, Alcantara LCJ, Pybus OG. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 2018;361(6405):894–9. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7115>.
- Ribeiro M, Antunes CMF. Febre amarela: estudo de um surto. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(5):523–31. <https://doi.org/10.1590/S0037-85822009000500009>. set-out.
- SES/MG. Informe Epidemiológico da Febre Amarela. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais (19/02). Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais, Subsecretaria de Vigilância e Proteção à Saúde, http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2019/jane_fev_mar/Febr_Amarela/Boletim_atualiza%C3%A7%C3%A3o_FA_12-02-2019.pdf; 2019. [accessed 06 march 2020].
- SES/MG. Dados de Cobertura Vacinal em Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Atualização em 13/02/2019. <http://www.saude.mg.gov.br/febreamarela>, 2019. [accessed 06 march 2020].
- Vasconcelos Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003;36(2):275–93. <https://doi.org/10.1590/S0037-85822003000200012>.
- WHO. World health organization. Yellow fever: International travel and health, <https://www.who.int/ith/diseases/yf/en/>; 2020. [accessed 28 february 2020].
- Ferreira CDC et al. The 17D–204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. Expert review of vaccines 2018. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1406800>.
- Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and

- its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis*. 2011;204(6):873–83. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir439>.
- [35] Staples JE, Barrett ADT, Wilder-Smith A, et al. Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of protection. *npj Vaccines* 2020;5:54. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0205-6>.
- [36] Muiyanga E et al. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J. Clin. Investig.* 2014;124:3147–58.
- [37] Miyaji KT et al. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2017;59:. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759002e2>.
- [38] Tuboi SH et al. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998–2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:169–75. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.04.001>.
- [39] Zimmermann Petra, Curtis Nigel. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Reviews* 2019;32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>.
- [40] Campi-Azevedo AC et al. 17DD Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. *Emerg Infect Dis* August 2019;25(8). <https://doi.org/10.3201/eid2508.181432>.
- [41] WHO. Weekly epidemiological record. Vaccines and vaccination against yellow fever. World Health Organization, Position Paper – June 2013. No. 27, 2013, 88, 269–284. <https://www.who.int/wer/2013/wer8827.pdf?ua=1>. [accessed 28 february 2020].
- [42] Vasconcelos PF. Single shot of 17D vaccine may not confer life-long protection against yellow fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113(2):135–7. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170347>.
- [43] Estofolete CF, Nogueira ML. Is a dose of 17D vaccine in the current context of Yellow Fever enough?. *Brazilian Journal of Microbiology*. Jul-Sep 2018;49(3):683–4. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.003>.
- [44] Caldas IR, Camacho LA, Freire MS, Torres CR, Martins RM, Homma A, et al. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine* 2014;32:4977–84. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.021>.
- [45] Campi-Azevedo AC et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(2):491–502. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1082693>.
- [46] IBF. Bioma Mata Atlântica. Instituto Brasileiro de Florestas, <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>; 2018. [accessed 06 march 2020].
- [47] LIRAA. Levantamento de Índice Rápido para Aedes aegypti (LIRAA). SES-MG, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, janeiro de 2019, <http://www.saude.mg.gov.br/haedes> [accessed 09 march 2020].
- [48] Machado VW et al. Serologic assessment of yellow fever immunity in the rural population of a yellow fever-endemic area in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46(2):166–71. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2012>.
- [49] Cutts Felicity T, Claquin Pierre, Danovaro-Holliday M Carolina, Rhoda Dale A. Monitoring vaccination coverage: Defining the role of surveys. *Vaccine* 2016;34(35):4103–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.053>.
- [50] Dimech W, Mulders MN. A 16-year review of seroprevalence studies on measles and rubella. *Vaccine* 2016;34:4110–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.002>.
- [51] Watson AM, Klimstra WB. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses*. 2017;9(4):77. <https://doi.org/10.3390/v9040077>.
- [52] Moura LC et al. Dengue na região do Alto do Jequitinhonha: análise das notificações. *Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Reg.* 2016;120.2.095-UFVJM.
- [53] SES/MG. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika, nº 116. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, SES/MG https://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim_Aedes_11-12-2018_AREA_TECNICA.pdf, 10/12/2018 [accessed 09 march 2020].