



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva

**Emergência de Febre Amarela no Brasil 2016 a 2018:
Um olhar da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) a luz
do Regulamento Sanitário Internacional**

Estudante: Carlos Frederico Campelo de Albuquerque e Melo
Orientador: Wildo Navegantes de Araújo

Brasília – DF
2020

Lombada

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA**

CARLOS FREDERICO CAMPELO DE ALBUQUERQUE E MELO

**Emergência de Febre Amarela no Brasil 2016 a 2018:
Um olhar da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) à luz do
Regulamento Sanitário Internacional**

Projeto apresentado como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Saúde Coletiva pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo

Brasília - DF

2020

CARLOS FREDERICO CAMPELO DE ALBUQUERQUE E MELO

**Emergência de Febre Amarela no Brasil 2016 a 2018:
Um olhar da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) à luz do
Regulamento Sanitário Internacional**

Projeto apresentado como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Saúde Coletiva pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo (Presidente)

Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Walter Massa Ramalho

Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade de Brasília

Dr. Eduardo Hage Carmo

Programa de Pós-Graduação, Escola Fiocruz de Governo

Prof. Dr. Edgar Merchan Hamann

Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Mauro Niskier Sanchez (Suplente)

Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade de Brasília

"Se a doença é uma expressão de vida individual sob condições desfavoráveis, a epidemia deve ser indicativa de distúrbios em maior escala da vida da massa."

(Rudolf Virchow)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua bondade.

A minha família, meus irmãos Ana, Dom, Tututu, Darlan e Nelson, minhas mães Maria do Carmo e Severina, minha esposa Alice e meu filho André por todo amor e suporte.

Aos Professores Dr. Wildo Navegantes de Araújo e Dr. Walter Massa Ramalho pelo apoio e condução para a conclusão do doutorado.

Ao meu amigo e ex-chefe Dr. Enrique Vazquez por todos os ensinamentos e exemplo.

Aos membros da banca avaliadora, Dr. Eduardo Hage Carmo, Dr. Edgar Merchan Hamann e Dr. Mauro Niskier pela disponibilidade, comentários e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Luiz Alcantara pelos ensinamentos e colaboração.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Saúde Coletiva da UnB.

Aos colegas da Organização Pan-americana da Saúde, do Ministério da Saúde e dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo

.

Muito obrigado!

RESUMO:

Introdução: A reemergência da Febre Amarela no Brasil, marcada pela epidemia iniciada em 2016 e que se estende até os dias atuais (2020) atingiu números de casos historicamente elevados (2.114 casos) nos anos de 2016 a 2018, concentrados na região extra-amazônica (2.104 casos), mais de quatro vezes a soma de todos os casos dos 20 anos anteriores.

A epidemia foi marcada pela persistência da transmissão do vírus em Primatas Não Humanos (PNH) inclusive nos períodos de baixa sazonalidade e atingiu áreas anteriormente consideradas sem risco, como os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e o leste do estado de São Paulo e sul da Bahia, ampliando a população com necessidade de vacinação antiamarílica em mais de 20.000.000 de habitantes e atualmente a todo o território nacional. Foram ainda reportados casos exportados do Brasil na França, na Holanda, na Argentina e no Chile.

Objetivo: Descrever a cooperação da OPAS no enfrentamento da epidemia de Febre Amarela do Brasil dos anos 2016 a 2018.

Método: Foi realizada uma revisão narrativa

Resultados/Discussão: A cooperação técnica da OPAS se concretizou de diversas formas: múltiplas capacitações, oficinas para troca de experiência e ações diretas nas áreas de vigilância epidemiológica, de epizootias, entomológica e laboratorial, no manejo de pacientes, estruturação da rede de assistência e estratégias de vacinação. Também houve disseminação do conhecimento com apoio a construção de cursos EaD, edição de guias, contratação de pessoal para os laboratórios e atividades de epidemiologia de campo e aquisição de insumos estratégicos que foram desde gelo seco e licenças de software a vacinas.

Também figuram entre as atividades de cooperações realizadas pela OPAS no Brasil, durante a epidemia de febre amarela, o apoio aos gestores na tomada de decisão sobre a amplificação da área de recomendação de vacina, o ajuste no esquema vacinal (adoção da dose única) e campanha com doses fracionadas.

A OPAS apoiou diversos estudos que utilizaram vigilância genômica em tempo real em conjunto com abordagens epidemiológicas e espaciais, abordando a diversidade genética viral e a dinâmica de transmissão do vírus da Febre Amarela pela geração de genomas completos oriundos de primatas não humanos (NHPs) e casos de

infecção humana dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. Esses estudos contribuíram para direcionar as ações de resposta do Brasil e responder às inquietações nacionais e internacionais sobre a dinâmica de transmissão, incluindo o tipo de ciclo de transmissão (silvestre ou urbano), velocidade de deslocamento, origem do vírus, número de introduções do vírus nos estados (única ou reintrodução).

Conclusão: A OPAS teve um papel central na condução técnica da emergência de Febre Amarela, contribuindo com o Ministério da Saúde (MS) e com grupos de pesquisa parceiros do MS na resposta nacional e na preparação dos países da região, congregando a expertise de cientistas envolvendo aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos, laboratorial, imunização e políticas públicas.

Palavras-chave: Febre Amarela; Surtos de Doenças; Epidemias; prevenção & controle; Cooperação Internacional; Organização Pan-Americana da Saúde.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1: Casos confirmados febre amarela	13
Figura 2: Dinâmica de transmissão da febre amarela.....	17
Figura 3: Distribuição dos casos humanos de febre amarela segundo local provável de infecção ...	18
Figura 4: Distribuição dos casos de febre amarela e classificação dos municípios segundo recomendação de vacina	20

FIGURAS PRIMEIRO MANUSCRITO

Figura 1: Casos confirmados de febre amarela em humanos e primatas não humanos por mês e linha do tempo da cooperação da OPAS na resposta a epidemia de febre amarela silvestre no Brasil de 2016 a 2019.....	59
---	----

FIGURAS SEGUNDO MANUSCRITO

Figura 1: Epidemiologia espacial e temporal do VFA e VCHIK em Minas Gerais (MG)	62
Figura 2: Distribuição do sexo e idade dos casos do VFA em MG (2016–2017).....	65
Figura 3: Filogenia molecular da epidemia brasileira do VFA.....	67
Figura 4: Dinâmicas espaciais e evolutivas do surto do VFA.....	70

FIGURAS TERCEIRO MANUSCRITO

Figura 1: Distribuição espacial e temporal dos casos de FA dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro durante 2017, localizados na região sudeste do Brasil e seus municípios.....	77
Figura 2: Filogenética molecular da epidemia brasileira do VFA.....	78
Figura 3: Árvore filogenética em escala temporal da atual epidemia de FA no Brasil.....	79
Figura 4: Filogenia de relógio molecular incluindo o clado que compreende os novos isolados mais todas as cepas do VFA do surto de 2017 a 2019 pertencentes ao clado da linhagem 1 do SA1	81
Figura 5: Dinâmica espaço-temporal da linhagem 1 do SA1 do VFA.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas do VFA e suas possíveis funções	15
Tabela 2: Caracterização de alguns eventos de epidemias e emergências de saúde pública	32
Quadro 1: Apresentação dos marcos históricos na construção da OPAS e da OMS.....	43
Quadro 2: Apresentação dos marcos históricos na construção do RSI	48
Quadro 3: Epidemia de febre amarela segundo anexo 2 do RSI	48

TABELAS MANUSCRITOS

TABELAS TERCEIRO ARTIGO

Tabela 1: Dados epidemiológicos para as amostras sequenciadas	76
Tabela 2: Estatísticas de sequenciamento para as 18 novas sequências obtidas	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESP	Evento de Saúde Pública
FA	Febre Amarela
FIN	Ficha Individual de Notificação
FII	Ficha Individual de Investigação
LN	Liga das Nações
LNCI	Lista de Notificação Compulsória Imediata
LNNC	Lista Nacional de Notificação Compulsória
MS	Ministério da Saúde
NCI	notificação compulsória imediata
NCS	notificação compulsória semanal
OEA	Organização dos Estados Americanos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OSP	Organização Sanitária Pan-americana
OIHP	Office International d'Hygiène Publique
PNCMD	Programas Nacionais de Prevenção e Controle da Malária e das doenças transmitidas pelo Aedes
RSI	Regulamento Sanitário Internacional
VFA	Vírus da Febre Amarela (do inglês Yellow Fever Vírus)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UnB	Universidade de Brasília
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	13
2- OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3- MÉTODO	23
3.1 Considerações éticas.....	23
4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
4.1 Vigilância Epidemiológica	23
4.2 Epidemias.....	30
4.3 Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde.....	40
4.4 Regulamento Sanitário Internacional	47
5- RESULTADOS / MANUSCRITOS	51
5.1 - O apagar da maior epidemia de febre amarela e a cooperação da OPAS durante a emergência de covid-19.....	54
5.2 – Primeiro Artigo: Monitoramento genômico e epidemiológico do potencial de transmissão do vírus da febre amarela	60
5.3 – Segundo Artigo: Reemergência e propagação do vírus da febre amarela no sudeste do Brasil, 2016–2019	73
6- CONCLUSÃO	89
7- REFERÊNCIAS	90
8- ANEXOS	93
ANEXO 1: Ficha de Notificação de Febre Amarela.....	93
ANEXO 2:Ficha de Notificação de Epizootia	95
ANEXO 3:Ficha de Notificação de Evento Adverso Pós-Vacinas	96
ANEXO 4:Ficha de achados clínicos e coleta de amostras/ necropsia	99
ANEXO 5:Ficha de identificação de primatas de vida livre	101
ANEXO 6:Ficha de investigação entomológica de febre amarela	103
ANEXO 7: The obscurance of the greatest sylvatic yellow fever epidemic and the cooperation of the PAHO during the COVID-19 pandemic.....	105
ANEXO 8: Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016 –2019	107
ANEXO 5: Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential.....	125

1- INTRODUÇÃO:

A transmissão da Febre Amarela (FA) no Brasil atingiu números de casos historicamente elevados (2.114 casos) nos anos de 2016 a 2018, concentrados na região extra-amazônica (2.104 casos), mais de quatro vezes a soma de todos os casos dos 20 anos anteriores. A epidemia de FA é classificada como uma epidemia multimodal¹ pois apesar de se observar picos epidêmicos de casos de FA em diversos anos e um marcado período sazonal de dezembro de um ano a maio do ano subsequente, as ondas epidêmicas correspondem a um mesmo processo epidêmico que engloba mais de um período sazonal. Desta forma, consideramos os picos epidêmicos dos anos 2016/2017 e de 2017/2018 como as duas ondas que marcam o pico de uma epidemia que se iniciou no Brasil em 2016, na região Centro-Oeste e se alastra até os dias atuais, ano 2020, na região Sul^{1,2} (Figura 1).

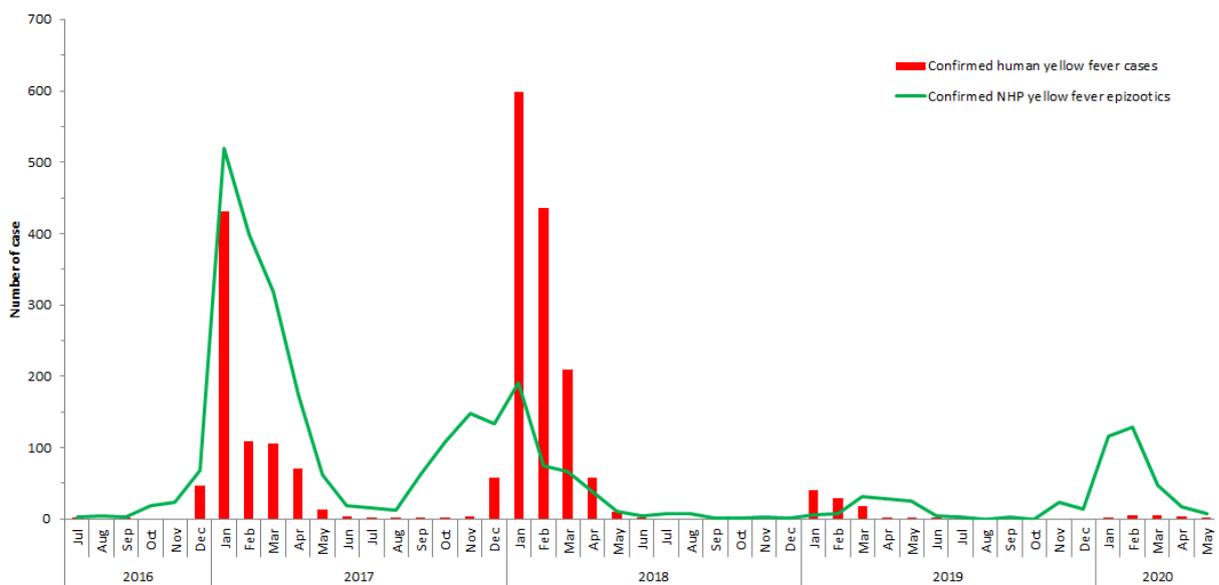


Figura 1: Casos confirmados febre amarela em humanos e primatas não humanos no Brasil por mês de início dos sintomas nos humanos e data de coleta das epizootias de 2016 a 2020.

Fonte: Ministério da Saúde^{1,2}

A figura 1 mostra que a epidemia foi marcada pela persistência da transmissão do vírus em Primatas Não Humanos (PNH) inclusive nos períodos de baixa sazonalidade

1.1 Febre Amarela

1.1.1 Doença:

A Febre Amarela é uma doença infecciosa aguda não contagiosa causada pelo vírus da Febre amarela (VFA). A Febre Amarela é transmitida ao homem mediante a picada de insetos hematófagos da família *Culicidae*, em especial dos gêneros *Haemagogus* e *Aedes*, conseqüentemente o seu agente etiológico pertence ao grupo das arbovírus (do inglês arthropod borne virus) e apresenta-se em sua forma clássica com febre hemorrágica de elevada letalidade. A febre amarela é a primeira febre hemorrágica viral descrita no mundo e a que provoca grande temor na sociedade moderna³.

1.1.2 Etiologia:

O VFA é o protótipo da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus*. É um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva. Possui 10.862 nucleotídeos, que como em todo *Flavivirus*, se distribuem em dez proteínas, sendo três estruturais (C, PrM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A e NS5), se destacando pela importância a proteína estrutural E (envelope) que induz a resposta imune e a proteína glicosilada NS1 que está presente na membrana das células infectadas, podendo os anticorpos contra NS1 mediar a lise destas células^{4,5}. A tabela 1, resume as proteínas do VFA e suas possíveis funções.

Tabela 1: Proteínas do VFA e suas possíveis funções³

Proteína	Descrição da proteína	Possíveis funções
C	Proteína do nucleocapsídeo viral	Formação do precursor do nucleocapsídeo, ligação do RNA, induz a formação de anticorpos protetores (neutralizantes)
prM	Proteína transmembrana viral associada à célula de origem; precursor da proteína M	Morfogênese viral transporte?
M	Proteína de membrana de partículas virais maduras	Componente associado à ligação e introdução do vírus na célula
E	Maior proteína do envelope. Muito conservada. É o antígeno inibidor da hemaglutinação	Montagem viral. Receptor de ligação Fusão com membrana celular. Maior antígeno viral (aglutinina). Induz formação de anticorpos IH
NS1	Associada à membrana. Forma dímeros Corresponde ao antígeno fixador do complemento	Maturação da partícula viral Participa na indução de anticorpos protetores
NS2a	Hidrofóbica. Pouco conservada	Provavelmente associada à maturação de NS1
NS2b	Hidrofóbica. Pouco conservada	Possível componente da protease/replicase Forma componentes do capsídeo durante a replicação viral
NS3	Altamente conservada	Multifuncional. Processa a poliproteína Participa da replicação do RNA. Possível helicase
NS4a	Hidrofóbica. Pouco conservada	Possível componente da replicase Associada à membrana
NS4b	Hidrofóbica. Pouco conservada	Possível componente da replicase Associada à membrana
NS5	Altamente conservada	Polimerase viral. Associada ao RNA viral. Participa da replicação viral

Fonte: Vasconcelos, 2003³

1.1.3 Vetores

1.1.3.1 Vetores Urbanos

O vetor urbano da febre amarela é o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti*, que tem hábitos domésticos, caracterizado por ser antropofílico (preferência por se alimentar de seres humanos), endofagia (preferência de por se alimentar dentro dos domicílios), endofilia (preferência de permanecer dentro dos domicílios), bem como preferência de ovopor em recipientes artificiais. O *Aedes aegypti* tem seu pico de atividade hematofágica nos horários crepusculares (Amanhecer e anoitecer). Como potencial vetor urbano temos o *Aedes albopictus*, que se procria tanto em ambientes urbanos como silvestres. A competência vetorial do *Aedes albopictus* para a transmissão da febre amarela já foi comprovada laboratorialmente, constatando seu potencial para fazer a conexão entre os ciclos de transmissão silvestre com o urbano^{6,5}.

Os mosquitos podem se infectar por transmissão transovariana, menos comum, ou a partir de casos virêmicos. Em média, duas semanas após repasto

sanguíneo (período de incubação extrínseco) a fêmea torna-se vetor com capacidade de transmissão.

1.1.3.2 Vetores Silvestres

Nas Américas, os vetores silvestres da Febre Amarela são os mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e o *Sabethes*, sendo o primeiro o principal responsável pela transmissão silvestre da doença. As espécies de *Haemagogus* incriminadas como vetores são: *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus spegazzinii* e *Haemagogus capricornii*. As espécies de *Sabethes* incriminadas como vetores são: *Sabethes chlopterus*, *Sabethes glaucodaemon*, *Sabethes cyaneus*, *Sabethes quasicyaneus* e *Sabethes soperi*. De todas estas espécies o *Haemagogus janthinomys* é o principal vetor da Febre Amarela no Brasil. Os vetores silvestres habitam o dossel (copa das árvores) em áreas de floresta densa e florestas de galeria, caracterizados por serem zoofilicos (preferência de se alimentarem em animais). Os vetores silvestres têm seu pico de atividade hematofágica nos horários de intensidade solar, entre as 9:00 e 15:00 horas. Desta forma para o homem adquirir a doença precisa adentrar na mata, residir ou trabalhar nas suas proximidades.

Na África Oriental, os vetores silvestres da Febre Amarela são os mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes africanus* responsável pela transmissão no dossel e o *Aedes simpsoni* fazendo a ponte entre os Primatas Não Humanos e o homem. Nas áreas de savana da África Ocidental as principais espécies vetores são: *Aedes furcufer*, *Aedes taylori* e *Aedes luteocephalus*⁵.

1.1.4 Hospedeiros vertebrados

Os primatas são os principais e mais sensíveis hospedeiros. O homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica na transmissão urbana. Na transmissão silvestre todos os Primatas Não Humanos do Novo Mundo, já estudados, são suscetíveis ao vírus. Os macacos do gênero *Alouatta* são os mais sensíveis.

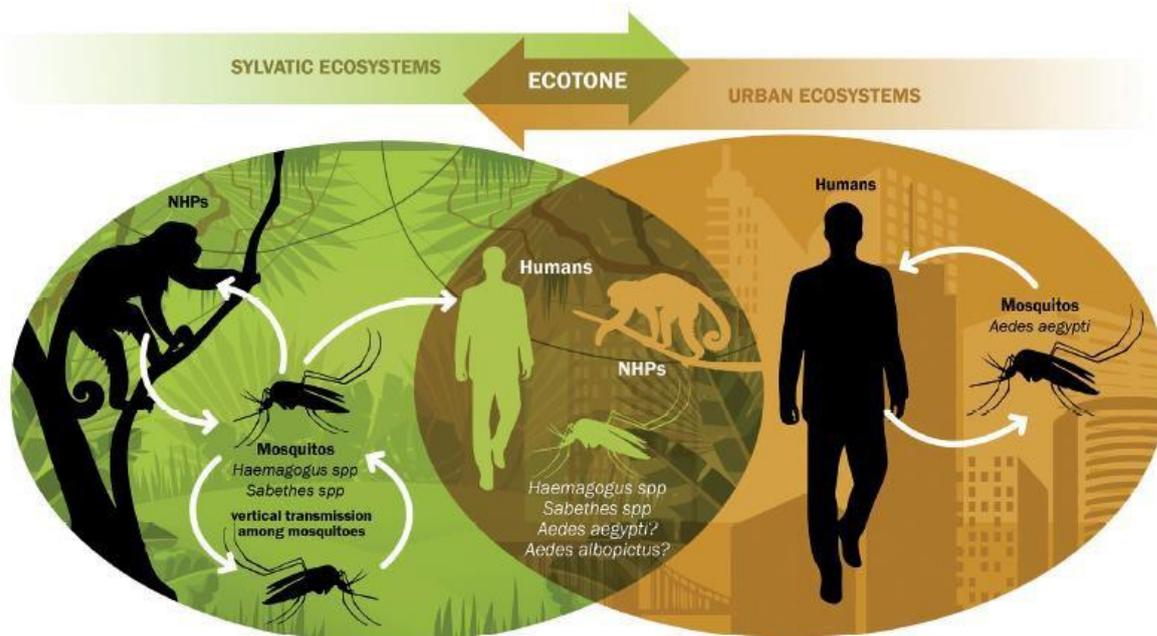
Decorrente da sensibilidade dos PNH ao vírus e a elevada mortalidade de algumas espécies (bugio), a vigilância destas epizootias é uma estratégia fundamental para a predição, geração de alerta e prevenção da transmissão do VFA (ANEXO 2).

1.1.5 Ciclos de Transmissão

Existem dois ciclos de Transmissão, o urbano e o silvestre. O ciclo de transmissão urbano é mantido pelo vetor *Aedes aegypti* e tem o homem como hospedeiro principal. O ciclo de transmissão silvestre ocorre principalmente no nível das copas das arvores, tendo como principal vetor os *Haemagogus janthinomus* e os macacos como hospedeiros vertebrados, sendo o homem um hospedeiro eventual e não amplificador da doença (Figura 2). No entanto o homem poder fazer a ponte entre o ciclo silvestre e o ciclo urbano, assim como os vetores, se destacando o *Aedes albopictus* como principal vetor com esta capacidade⁷.

A epidemia de 2016/2017 e 2017/2018 se destacou por ser uma epidemia de febre amarela silvestre e foram detectados alguns ciclos de transmissão silvestres em áreas urbanas.

Figura 2: Dinâmica de transmissão da febre amarela.



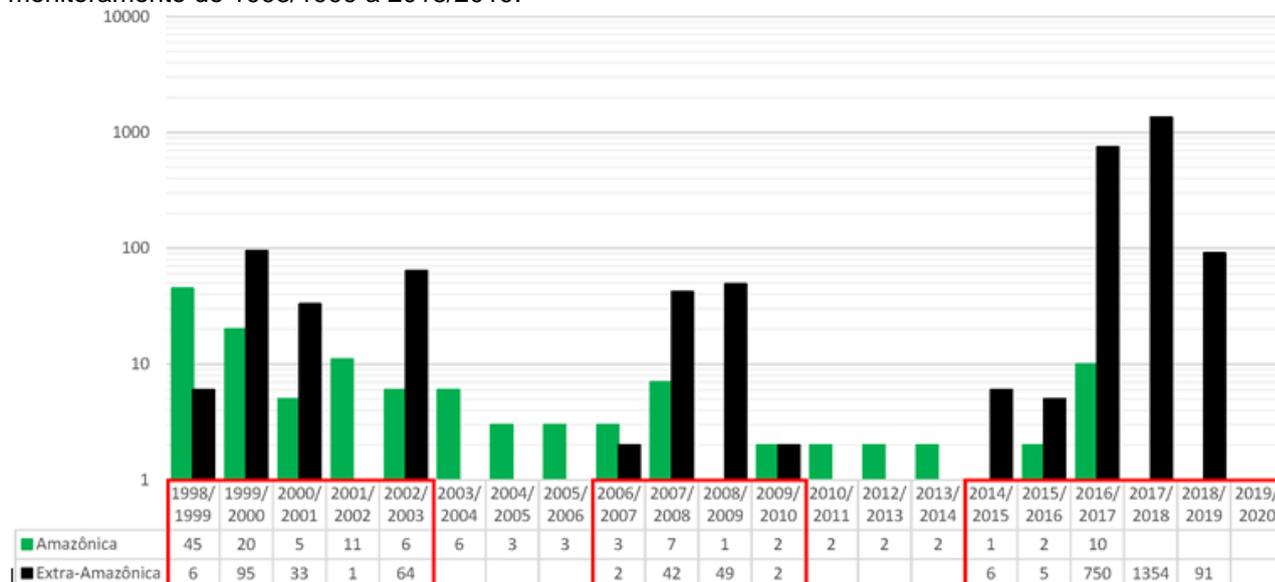
Fonte Cristina Possas, Ricardo Lourenço de Oliveira *et al*, 2018⁸.

No Brasil, para fins de vigilância epidemiológica se diferencia a região amazônica, onde há endemia de FA silvestre, das outras regiões, que são denominadas de região extra-amazônica. Na região extra-amazônica os períodos epidêmicos são registrados ocasionalmente, caracterizando a reemergência do vírus (Figura 3).

Nas últimas décadas se observa uma expansão recorrente da área de circulação viral. Nos últimos anos o vírus alcançou a região do bioma Mata Atlântica,

que abriga uma ampla diversidade de PNH e de vetores silvestres, e onde há grandes centros urbanos, aumentando o potencial de risco para a transmissão urbana.

Figura 3: Distribuição dos casos humanos de febre amarela registrados, segundo a região do local provável de infecção (LPI), Amazônica ou extra-Amazônica no Brasil, referente aos períodos de monitoramento de 1998/1999 a 2018/2019.



Fonte: Coordenação-Geral de Vigilância das Arboviroses (CGARB)/Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis (DEIDT)/Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/Ministério da Saúde (MS).

1.1.6 Manifestações Clínicas

Além das infecções frustras (assintomáticas) a FA se classifica em quatro formas, leve, moderada, grave e maligna.

Na forma leve, os únicos sintomas são a febre e a cefaleia, em geral, com duração máxima de dois dias, sendo um quadro benigno autolimitado. A forma moderada apresenta além da febre e cefaleia outros sintomas como, mialgias, mal-estar, dor lombossacral, congestão conjuntival, rubor facial e do pescoço, artralgias, náuseas em geral sem vômitos, adinamia e astenia. Estes quadros evoluem de forma satisfatória entre dois e quatro dias e, junto com os casos leves, representam 90% das ocorrências que, no entanto, tendem a não serem detectados.

Os quadros amarílicos graves apresentam além de um ou mais sintomas das formas anteriores, hematêmese (vômitos hemorrágicos), febre elevada (39 a 40° C), mialgias generalizadas, icterícias, elevação das bilirrubinas (especialmente a bil. direta) e das transaminases (decorrentes de necrose dos tecidos hepáticos), oligúria e elevação da creatinina (decorrentes da insuficiência renal) que conduzem para hospitalização. A forma maligna é caracterizada pela intensificação dos sintomas anteriores e é considerada uma emergência médica e apresenta outras formas de

hemorragias, como melena, epistaxe, gengivorragia, otorragia, urorragia e metrorragia com volumes consideráveis de sangue. A letalidade destes quadros pode superar os 50%.

1.1.7 Profilaxia

A FA é uma doença imunoprevenível, utilizando-se uma vacina de vírus atenuado da cepa 17DD que confere imunidade entre 95% a 99% dos vacinados acima de nove meses de idade. Desde 2013 a OMS recomenda uma única dose com mais 85% de persistência de anticorpos neutralizantes por toda a vida. Esse modelo foi adotado pelo Brasil em 2017, anteriormente o Brasil promovia um reforço da vacina a cada 10 anos. Antes da epidemia de 2016/2017 a área de recomendação do Brasil se restringia a região amazônica, centro-oeste e parte oeste dos estados da Bahia, São Paulo e da região sul. Com a epidemia, a área de recomendação da vacina foi ampliada progressivamente e, atualmente, é recomendada para todo o território nacional.

Na epidemia de 2017/2018, com o vírus da febre amarela disseminando em municípios de grande quantitativo populacional e de baixa cobertura vacinal, devida a não recomendação de vacina, a demanda por vacina superava a quantidade de doses de vacinas disponíveis. Neste contexto o Brasil utilizou dose fracionada em São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia².

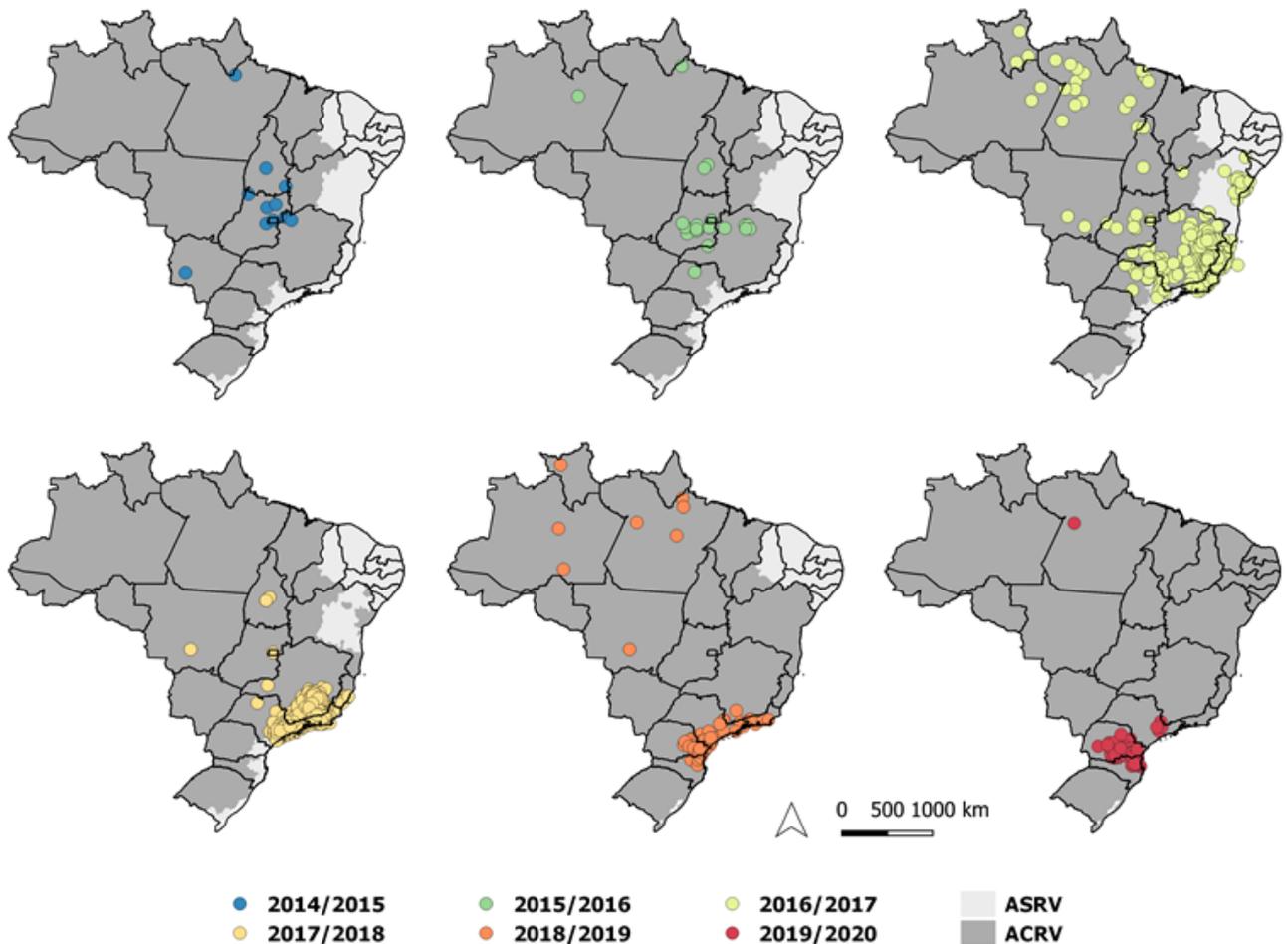
No ciclo de transmissão urbana, o controle vetorial do *Aedes aegypti* é medida preventiva complementar à vacinação, que é a medida de profilaxia da FA.

Os dados de cobertura vacinal são informações importantes para o processo de decisão relacionados à medidas de proteção de populações expostas ao risco de transmissão da doença². Em geral, quando se trata de vacinação, busca-se o atingimento da imunidade de rebanho que, segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica, é a resistência de um grupo ou população à introdução e disseminação de um agente infeccioso baseada na elevada proporção de indivíduos imunes entre os membros desse grupo ou população, e na uniforme distribuição desses indivíduos imunes². Contudo, no caso da Febre Amarela, devido o ciclo de transmissão silvestre, torna-se inviável obtenção de imunidade de rebanho.

Assim, no caso de Febre Amarela, é importante o atingimento de cem por cento de cobertura vacinal em área com recomendação de vacina (ACRV). A delimitação dessa área leva em conta evidências da circulação viral, ecossistemas (bacias

hidrográficas, vegetação), corredores ecológicos, trânsito de pessoas, tráfico de animais silvestres e critérios de ordem operacional e organização da rede de serviços de saúde, que facilitem procedimentos operacionais e logísticos nos municípios (BRASIL, 2009, Caderno 9). As áreas sem circulação de vírus amarelo e, por consequência, sem risco de transmissão, são denominadas área sem recomendação de vacina (ASRV). Nessas áreas ressalta-se a necessidade de vigilância de casos de epizootia, visto que esses precedem casos na população humana e servem de indicadores para o risco de transmissão, podendo indicar regiões onde se deve monitorar a cobertura vacinal e realizar campanha de vacinação. Como se observa na figura 4, a partir da epidemia de 2016/2017, a detecção da circulação do vírus amarelo em áreas anteriormente sem ocorrência do ciclo silvestre levou à ampliação das ACRV.

Figura 4: Distribuição dos municípios com casos humanos e/ou epizootias em PNH confirmados durante reemergência extra-Amazônica da febre amarela, por período de monitoramento (julho a junho), 2014/2015 a 2019/2020, Brasil e classificação dos municípios segundo recomendação de vacina.



Fonte: CGARB / DEIDT / SVS / MS

1.1.8 Estratégia de eliminação das Epidemias de Febre Amarela

A Estratégia de eliminação das Epidemias de Febre Amarela (EYE, sigla em inglês) é uma estratégia abrangente e de longo prazo construída sobre as lições aprendidas, que visa acabar com a epidemia de febre amarela até 2026 e consiste em três objetivos estratégicos: (i) proteger populações em risco; (ii) prevenir a propagação internacional; (iii) conter os surtos rapidamente⁹. Para isso se promove o acesso a vacina e o fortalecimento do Regulamento Sanitário Internacional.

A estratégia EYE foi aprovada na 67^a sessão do comitê regional da OMS para a África e pelo Grupo Consultivo Técnico Regional de Imunização (RITAG, sigla em inglês) da Organização Pan-americana da Saúde (OPAS) em 2017.

A Organização Pan-Americana da Saúde, desde sua criação em 1902, com o nome de Oficina Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas, coopera tecnicamente para eliminação da febre amarela e logrou a eliminação da Febre Amarela Urbana em 1942¹⁰. No entanto, nem todos os países das Américas lograram a erradicação do *Aedes aegypti* e atualmente esse vetor é amplamente distribuído na região das américas.

Este trabalho justifica-se devido ao relativo enfraquecimento do papel da Organização Mundial de Saúde (OMS) na coordenação internacional dos esforços do ponto de vista político frente as epidemias, tais como a COVID-19, diminuindo tanto o espírito solidário entre as Nações com o enfoque multilateral necessário para resposta, materializado pela retirada do financiamento da OMS por parte de nações poderosas. Ainda com maior importância, o enfraquecimento da resposta a epidemia de Febre Amarela em curso no Brasil que continua mantendo altas taxas de transmissão em PNH na região Sul do Brasil e se deslocando em direção ao Paraguai e a Argentina.

2- OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Descrever a cooperação da OPAS no enfrentamento da epidemia de Febre Amarela do Brasil dos anos 2016 a 2018.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Descrever a cooperação da OPAS frente a epidemia de Febre Amarela no Brasil nos anos de 2016 a 2018;
- Descrever a evolução/histórico da OPAS/OMS e seu funcionamento;
- Apresentar os trabalhos de Vigilância Genômica da Febre Amarela apoiados pela OPAS como exemplos de cooperação técnica;

3- MÉTODO:

Trata-se de uma revisão narrativa sobre a atuação da OPAS na resposta da epidemia de febre amarela¹⁷, com o objetivo de contribuir com as ações desta Organização na colaboração com o MS na resposta às emergências de saúde pública. O recorte da revisão narrativa foi a epidemia de febre amarela no Brasil para os anos de 2016 a 2020, priorizando os dados oficiais do Ministério da Saúde do Brasil e da OPAS, incluído os boletins epidemiológicos, alertas epidemiológicos, guias e manuais editados e reeditados no período e os artigos científicos com autoria ou coautoria dos gestores da OPAS e do Ministério da Saúde. As análises críticas das ações de cooperação foram pessoais.

Incorporando a apresentação do resultado das pesquisas envolvendo a vigilância genômica, dois artigos ilustram no interior de seus textos o detalhamento das metodologias utilizadas para apresentar a estratégia de vigilância com a finalidade de datação genética da epidemia, bem como a caracterização da transmissão silvestre da doença.

3.5 Considerações Éticas:

Este estudo respeita os princípios da ética em pesquisa e não envolve seres humanos, estando em conformidade com a Resolução número 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde.

4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

4.1 Vigilância Epidemiológica

As ações de vigilância epidemiológica no Brasil estão normatizadas por meio de alguns instrumentos legais, que estabeleceram a organização do SUS. A atual legislação que normatiza os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde é a Portaria de Consolidação do Gabinete do Ministro do Ministério da Saúde Nº 4, de 28 de setembro de 2017. Seu anexo III capítulo I, com origem na Portaria GM/MS nº 1.378, 9 de julho de 2013, “regulamenta as responsabilidades e define diretrizes para execução e financiamento das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios, relativos ao Sistema Nacional de Vigilância em Saúde e Sistema Nacional de Vigilância Sanitária”.

A portaria conceitua vigilância em saúde como “um processo contínuo e sistemático de coleta, consolidação, análise e disseminação de dados sobre eventos relacionados à saúde, visando o planejamento e a implementação de medidas de saúde pública para a proteção da saúde da população, a prevenção e controle de agravos e doenças, bem como a promoção da saúde”.

A portaria de consolidação, em seu anexo V - Capítulo I, com origem na Portaria GM/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016, define a Lista Nacional de Notificação Compulsória (LNNC) de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, considerando a Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que dispõe “sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências” e considerando sua regulamentação pelo Decreto 78.231/76.

Dois definições fundamentais relacionadas ao processo de notificação de doenças são descritas na portaria. A primeira diz respeito ao evento de saúde pública (ESP) descrito como uma, “situação que pode constituir potencial ameaça à saúde pública, como a ocorrência de surto ou epidemia, doença ou agravo de causa desconhecida, alteração no padrão clínico-epidemiológico das doenças conhecidas, considerando o potencial de disseminação, a magnitude, a gravidade, a severidade, a transcendência e a vulnerabilidade, bem como epizootias ou agravos decorrentes de desastres ou acidentes”. A segunda se refere a descrição de notificação compulsória como uma “comunicação obrigatória à autoridade de saúde, realizada pelos médicos, profissionais de saúde ou responsáveis pelos estabelecimentos de saúde, públicos ou privados, sobre a ocorrência de suspeita ou confirmação de doença, agravo ou evento de saúde pública, descritos no Anexo 1 do Anexo V, podendo ser imediata ou semanal”.

A notificação compulsória tem duas categorias. A notificação compulsória imediata (NCI), em até 24 horas, e a notificação compulsória semanal (NCS). No contexto deste trabalho, temos como de NCI os eventos adversos graves ou óbitos pós-vacinação, os casos de Febre Amarela e a morte de primatas não humanos, considerada um ESP.

A coleta de dados das notificações é feita de forma passiva e sistemática pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). A regulação das atividades da vigilância epidemiológica com relação à coleta, fluxo e a periodicidade de envio de dados da notificação compulsória de doenças por meio do SINAN foi estabelecida pela Instrução Normativa Nº 2, de 22 de novembro de 2005.

Um aspecto importante, considerado um incentivo para a utilização do SINAN pelas SES e SMS, foi o estabelecimento de parâmetros de regularidade vinculados à manutenção do repasse de recursos do Piso Fixo de Vigilância em Saúde (PFVS) e do Piso Variável de Vigilância em Saúde (PVVS) do Bloco de Vigilância em Saúde, consideradas fontes financeiras de recursos federais fundamentais para o funcionamento dos sistemas de vigilâncias. O não cumprimento dos parâmetros de regularidade pelas SMS, no caso 8 semanas consecutivas sem envio de informação para as SES e de dois meses do Distrito Federal para o MS, ocasiona penalidades como por exemplo o cancelamento dos repasses dos recursos financeiros. Embora se considere esta medida um avanço, ela traz uma limitação para o sistema de vigilância epidemiológica, uma vez que ao mesmo tempo que fortalece o uso do SINAN, contradiz com os tempos estipulados para a notificação compulsória imediata.

O SINAN tem como instrumentos de coleta de dados dos casos notificados dois formulários padronizados: a Ficha Individual de Notificação (FIN), (ANEXO I), que é preenchida pelas unidades assistenciais para cada paciente quando há suspeita ou confirmação da ocorrência de problema de saúde de notificação compulsória, conforme estabelecido na Portaria GM/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 (ou de interesse nacional, estadual e municipal); e a Ficha Individual de Investigação (FII), que é um roteiro de investigação preenchida pelos Serviços Municipais de Vigilância ou Unidades de Saúde capacitadas para a realização da investigação epidemiológica.

A FIN contém as variáveis de interesse para vigilância epidemiológica, como local provável de infecção, classificação dos casos, critério de confirmação dos casos, data de início dos sintomas, dentre outras, que apoiam a caracterização de Pessoa, Tempo e Lugar, além de outros indicadores epidemiológicos e operacionais que permitem a vigilância epidemiológica exercer suas competências e alcançar seus objetivos.

4.1.1 Vigilância de Febre Amarela

Os objetivos da vigilância epidemiológica da Febre Amarela são reduzir a incidência de Febre Amarela silvestre, impedir a transmissão urbana e detectar oportunamente a transmissão viral para orientar as medidas de controle ¹⁸. Para atingir seus objetivos a Vigilância de Febre Amarela monitora de forma sistemática no SINAN os casos de Febre Amarela em Humanos (ANEXO 1) e em Primatas Não-Humanos (epizootias) (ANEXO 2), bem como via Sistema de Informação da Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinação (SIEAPV) os Eventos Pós-Vacinação da febre amarela (ANEXO 4). De forma não sistemática porém complementar se promove a Vigilância de Primatas de vida livre (ANEXO 5) e Investigação entomológica (ANEXO 6).

Os casos humanos suspeitos de febre amarela são notificados pela “ficha de notificação/investigação de febre amarela” no SINAN (ANEXO 1). A ficha de notificação/investigação de febre amarela coleta informações além dos tradicionais dados gerais da notificação (tipo de notificação, doença, data da notificação, local de notificação etc.), dados do indivíduo (idade, sexo, raça, escolaridade etc.), dados de residência, dados clínicos, dados laboratoriais. A ficha também coleta dados de antecedentes epidemiológicos, como ocorrência de epizootias, isolamento de vírus em mosquito, presença de mosquito *Aedes aegypti* e vacinação e para conclusão do caso coleta informação de classificação do ciclo de transmissão (silvestre ou urbano) e as atividades desenvolvidas no local provável de infecção (trabalho, turismo ou lazer).

Essas informações da ficha de notificação são suficientes para descrever a doença, vários de seus determinantes e nortear ações de prevenção, como população alvo de campanhas vacinais e avaliação de risco de reurbanização.

É possível exemplificar a atuação da vigilância na epidemia de 2016 a 2020, pela detecção de casos de febre amarela em áreas anteriormente consideradas sem risco, como os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo e o leste do estado de São Paulo. Esta detecção feita pela vigilância deu subsídios para a ampliação da área de recomendação de vacina no território nacional.

4.1.2 Vigilância das Epizootias

A vigilância das epizootias objetiva detectar de forma antecipada a ocorrência da circulação de doenças em animais silvestres antes que acometam humanos. Para vigilância da febre amarela, as epizootias são eventos sentinelas que demonstram a circulação do vírus amarílico no território e funcionam como alerta para ações de prevenção e controle da doença. Uma vez que o ciclo de transmissão da doença se mantém natural e exclusivamente de forma silvestre, principalmente após a eliminação do *Aedes aegypti* das Américas em 1942. Mesmo com a reinfestação do *Aedes aegypti* e sua ampla distribuição no território não têm ocorrido epidemias de febre amarela urbana expressivas, nem a manutenção do ciclo urbano no Brasil.

A notificação compulsória das epizootias é uma das fortalezas da vigilância da febre amarela e se dá de forma oficial pela “ficha de notificação de epizootia” no SINAN (ANEXO 2), não sendo específica para detecção de PNH nem voltada unicamente para Febre Amarela. É importante ressaltar que outras epizootias também são de grande importância para Saúde pública, como a epizootia de equinos tem significativo valor para a vigilância epidemiológica das encefalites, das aves para a febre do nilo ocidental e para influenza e dos morcegos e caninos que tem importante papel na vigilância da raiva. Cabe esclarecer que uma única notificação de epizootia pode se referir a vários animais doentes e/ou mortos que estejam envolvidos no mesmo evento.

Com o intuito de qualificar a vigilância das epizootias em PNH para vigilância da Febre Amarela é realizado um detalhamento das epizootias de PNH na “ficha de achados clínicos e coleta de amostras/necropsia” (ANEXO 4), não incorporado ao SINAN. Esse instrumento apresenta de forma detalhadas características do animal e do local onde o animal adoeceu ou morreu, como a espécie, a idade, o bioma, o tipo de localidade etc.

Ainda como instrumento de vigilância das epizootias coordenado pelo Centro de Informação em Saúde Silvestre (CISS) da Fiocruz (que desenvolveu e gerencia o Sistema de Informação em Saúde Silvestre (SISS-Geo). Esse sistema é a plataforma computacional criada num conceito de vigilância participativa dos cidadãos, de agentes de saúde, de agentes ambientais e agentes agropecuários para gerar modelos de alerta de ocorrências de agravos na fauna silvestre (figura 3).

A vigilância das epizootias se mostrou de grande valia no processo epidêmico de 2016 a 2018, uma vez que sua detecção ocorreu aproximadamente 1 mês antes dos casos humanos, cumprindo com sua função de iniciar as ações de prevenção e controle de casos em humanos (Figura 1).

A Vigilância de PNH também detectou epizootias de primatas do gênero *Callithrix* durante a epidemia de 2016/2017 e 2017/2018, porém, apesar das biopsias apontarem para mortes por outras causas, foi identificado a presença do vírus amarelo em uma fração destes *Callithrix*. Desta forma, apesar das epizootias de *Callithrix* não terem sido causadas por febre amarela, foram suficientes para identificar a presença do vírus em PNH e confirmou a presença do vírus no leste Baiano, uma área até então sem recomendação de febre amarela e após esses achados imediatamente incluída como área de recomendação de vacina.¹⁶

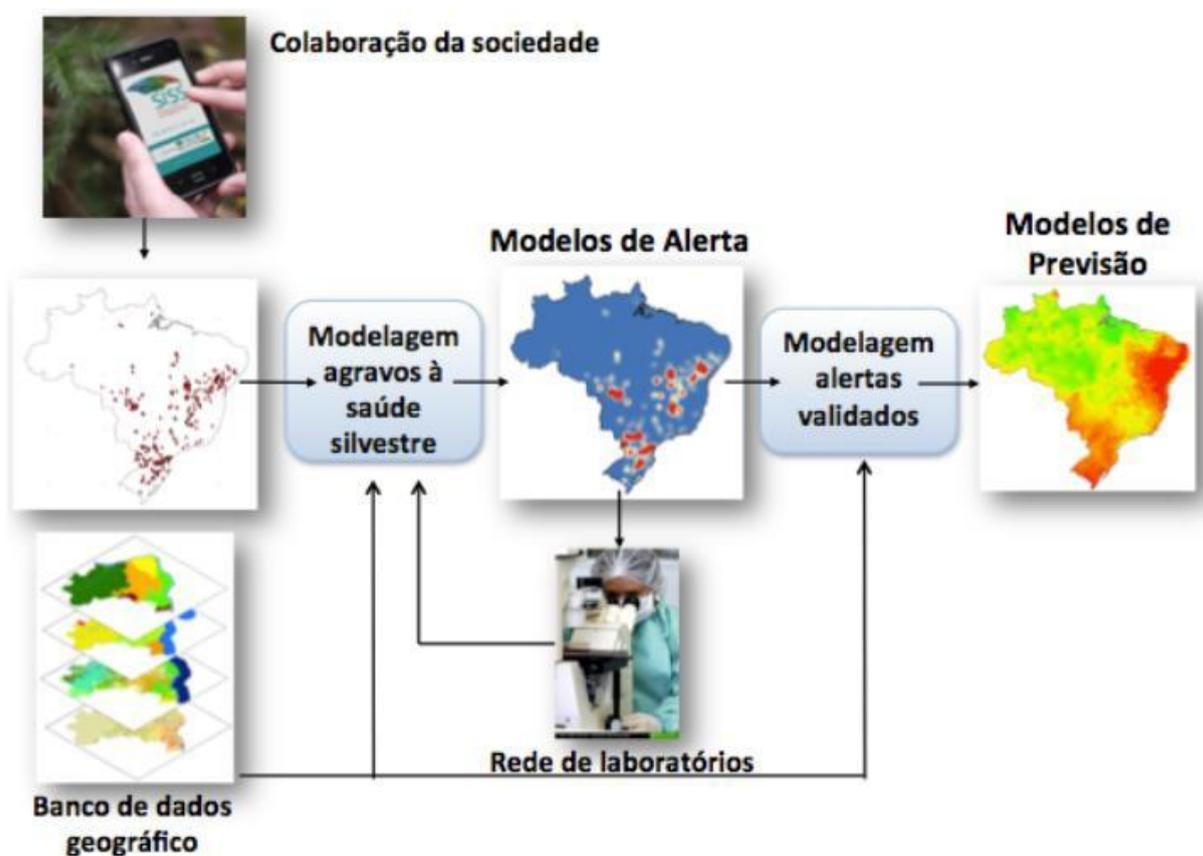


Figura 3: Fluxo de funcionamento do Sistema de Informação em Saúde Silvestre (SISS-Geo).

4.1.3 Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinação

A vacina de febre amarela, apesar de ser considerada uma vacina segura, é uma vacina de vírus atenuado produzida em embriões de galinha e tem o risco de gerar alergias, doença neurológica aguda associada a vacina e doença viscerotrópica. Desta forma a vacina é um dos objetos do Sistema de Informação da Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinação (SIEAPV), sendo que os Eventos Pós-Vacinação da febre amarela são monitorados pelo “formulário para notificação/investigação de eventos pós-vacinação associados ao uso de Vacina, Soro ou imunoglobulina¹⁹ (ANEXO 4).

Os dados levantados no SIEAPV permitem caracterizar a pessoa vacinada (incluindo histórico patológico pregresso), a vacina (Data, lote, fabricante, número da dose etc), antecedentes epidemiológicos, caracterização do evento adverso pós-vacinal, informações clínicas, laboratoriais e erros programáticos.

Na epidemia de 2017/2018, 0,007% (1.942 doses) das vacinas apresentaram algum Evento Adverso Pós-Vacinal, sendo 513 Eventos Graves².

4.1.4 Vigilância Entomológica

A vigilância entomológica se dá principalmente de forma passiva, chamada de investigação entomológica, em contraste a vigilância ativa, chamada de monitoramento entomológico. Orienta-se a realização da investigação entomológica no local provável de infecção dos casos humanos e das epizootias no local onde o animal foi encontrado morto ou doente.

Para orientar a investigação entomológica existe a “ficha de investigação entomológica da febre amarela” (Anexo 6). A ficha não está incorporada ao SINAN e seus dados permitem caracterizar o motivo da coleta, definir o local, os horários de maior atividade dos vetores, o método de coleta, a modalidade (Solo ou copa das arvores) e dados climáticos. Os dados estratificados de espécies e infecção são levantados em laboratório e não é sistematizada sua forma de coleta.

Para a epidemia de 2016 a 2018 a vigilância entomológica teve papel importante na classificação do ciclo de transmissão como silvestre.

Outro grande fruto da vigilância entomológica foi a detecção, pelo Instituto Evandro Chagas da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, do vírus da

Febre Amarela em mosquitos *Aedes albopictus*, em Minas Gerais, que já tinham sua competência vetorial comprovada e alertada como o vetor capaz de fazer a ponte entre transmissão silvestre e urbana, ampliando o risco real de reurbanização da Febre.

4.2 Epidemias / Emergência de Saúde Pública

Histórico das epidemias:

Em virtude das condições sanitárias das cidades e do desconhecimento da etiologia das doenças infecciosas, grandes epidemias assolaram as nações no passado, dizimando suas populações, limitando o crescimento demográfico e mudando, muitas vezes, o curso da história. Tais epidemias foram genericamente rotuladas de peste, embora muitas delas não tenham sido causadas pelo bacilo da peste (*Yersinia pestis*) e fossem, provavelmente, epidemias de varíola, tifo exantemático, cólera, malária ou febre tifoide.²⁰

Sem pretender atestar os fatos narrados na antiguidade, mas mostrando alguns exemplos antigos de como eram retratadas as epidemias, faremos a descrição de alguns relatos significativos que moldaram a cultura ocidental (Judaico-cristã e Greco-Romana).

Longe de esgotar o tema da história das epidemias e consciente de não relatar significativas epidemias como a de Atenas de 428 a.C., a peste Justiniana que assolou o império bizantino em 542, nem diversas epidemias dos séculos XVII, XVIII, XIX e XIX²¹, que marcaram a humanidade, vamos fazer um breve itinerário por algumas epidemias que nos conduzirão ao entendimento da construção do Regulamento Sanitário Internacional.

Inicialmente serão descritas algumas epidemias da antiguidade (entre o século XII a.C. e V a.C.), marcadas pela conexão atribuída à ação divina. Em seguida, serão abordadas a peste negra, que caracteriza de forma singular as epidemias do período medieval, e a cólera em Londres, no início da Idade Contemporânea.

A estrutura de apresentação é uma breve descrição do relato, seguido da doença apresentada no texto e uma hipótese diagnóstica atual de interpretação do autor, e segundo o texto, o agente causador atribuído pelo autor do próprio relato, as pessoas afetadas (pessoa), o período (tempo) e lugar de ocorrência, as medidas sanitárias adotadas, as relações internacionais envolvidas e alguns conceitos que perduraram

até a atualidade. A tabela 2 traz um resumo dessa caracterização.

Deve-se considerar que na antiguidade o componente divino é o que explicava as relações invisíveis do processo saúde-doença, bem como os relatos tinham um cunho moral em favor dos costumes culturais do povo protagonista na narrativa. Outra consideração importante é que muitos dos textos antigos são de caráter religioso onde o objetivo é mostrar o poder de sua divindade tanto sobre o homem, como sobre o ambiente e sobre outros Deuses. No entanto, é possível retirar dos relatos antigos ideias e conceitos importantes que se mantiveram até os dias presentes, como doenças não apenas atingindo um indivíduo mas uma população, ou seja, “epidemias” como fator devastador da economia e da ordem social, rituais e medidas para mitigação das “epidemias”, grupos específicos de pessoas/profissionais responsáveis para lidar com a doença, distribuição da doença nas populações, de acordo com características específicas, como maus costumes e etnias.

Tabela 2. Caracterização de alguns eventos de epidemias e emergências de saúde pública.						
	10 Pragas do Egito	Filisteus e a peste	Peste de Xerxes	Roma (Século V a.C.)	Peste Negra	Londres (Cólera)
Doença	úlceras seguidas de morte de primogênitos e morte de todos os rebanhos	morte, tumores bolhosos	pragas, disenteria e morte	fome e peste	Peste bubônica	Cólera
Hipótese diagnóstico	uma possibilidade é gastroenterite ou a febre tifoide.	poderia ser a peste bubônica.	possível se tratar da Shigelose ou Disenteria Bacilar.	possível que se refira a Malária		
Agente Causador	ação divina com ligação a acúmulo de rãs mortas e infestação de moscas	ação divina vinculada a arca da aliança. Possível associação com os ratos	fome, má alimentação, falta de água e ingestão de águas inapropriadas e exaustão física.	Cólera dos deuses.	O ar e o contato com doentes	Água contaminada de fonte específica por saída de esgoto.
Pessoa ou populações afetadas	População egípcia e animais	Os filisteus e os hebreus de Bete-Semes	Militares persas.	Romanos e territórios vizinhos	Toda população europeia e partes do norte da África e Ásia central.	População que consumiam água contaminada.
Tempo	Século 12 a.c.	segunda metade do século IX a.C., duração de 7 meses	setembro de 480 a.c., duração de 45 dias.	492 a 433 a.C.	1333 a 1351	1849
Lugar	Antigo Egito	Oriente médio	Grécia, antiga.	Roma, e arredores	Eurásia e norte da África	Londres, Inglaterra
Medidas sanitárias	Orações, para controlar as úlceras e morte de animais, e ritual envolvendo dieta específica e aspersão de sangue nas casas.	Devolução da arca da aliança, envio de oferendas e adoções de medidas para cuidado da arca.	Retirar os enfermos da macha e deixá-los com recomendação de serem cuidados.	Convocação de sacerdotes, consulta a livros proféticos e construção de templo ao Deus Grego Apolo.	Medidas de prevenção, uso de equipamentos de proteção, distanciamento social, quarentena, alimentação específica para doentes, saneamento ambiental.	interdição da fonte propagadora, comunicação da população e adoção de medidas para consumo seguro de água e alimentos
Relações Internacionais	Conflito entre egípcios e hebreus, sendo os hebreus associados as pragas e expulsos das terras egípcias.	Xenofobia devido à associação da peste com objeto sagrado de outro povo	Estigmatização de população estrangeira associado a hábitos alimentares.	Promoção de conflitos entre povos e reordenamento econômico.	Devastação de cidades, reinos e da produção, Reordenamento social/religiosa.	impactos econômicos produção industrial e comércio marítimo.
Conceitos ainda atuais	Profissionais específicos para tratar a epidemia (sacerdotes e magos). Ideia de heterogeneidade na transmissão na população. Existência de medidas de controle a doença.	Existência de uma fonte de contaminação da doença e determinação de grupo específico de profissionais para tratar com a fonte infecciosa.	Associação de doença a má alimentação e privação de descanso.	Epidemia causa um estado de exceção, diminuição de direitos da população e de mudança nas leis no período de epidemia. As epidemias não afetam apenas a situação de saúde mais a situação política e econômica. A doença pode afligir todas povos e classes.		Fontes de transmissão das doenças, distribuição heterogeneia da doença, Medição de risco, caracterização em pessoa, tempo e lugar, definição de medida de controle.

4.2.1. Epidemias da antiguidade

10 Pragas do Egito³

“Yahweh disse...eu estenderei minha mão sobre o Egito”. (Êxodo 7,4)

Descrição: O relato é retirado dos livros bíblicos de Êxodo capítulos 7 a 12 e dos Salmos 78 e 105. Temos que o povo hebreu estava como escravo do povo egípcio e é instruído pelo seu Deus, Yahweh, a pedir ao Faraó que o liberte e como forma de persuasão informar que se ele não for liberto o Deus realizaria um “Golpe sobre o Egito”. Esse golpe são as pragas. Neste sentido, existiam pragas que seriam os desastres, a contaminação das águas, as chuvas de granizo muito intensas e uma escuridão por 3 dias; outras pragas envolviam a infestação de animais, rãs, piolhos ou mosquitos (dependendo da tradução), moscas e gafanhotos e, por fim, ocorreriam as doenças que seriam uma zoonose que mataria os rebanhos de ruminantes, úlceras em toda a população egípcia e a última uma doença letal que mataria os primogênitos dos Egípcios, tanto primogênitos dos humanos como dos animais.

Para interromper as pragas seriam realizadas orações pelo líder religioso dos israelitas, Moisés, e para não ser afetada pela doença que mataria os primogênitos os israelitas realizariam um ritual, a Páscoa. Essa, resumidamente, consistia na alimentação de um cordeiro, de pães sem fermento e ervas amargas, bem como a marcação das casas com o sangue do cordeiro. As demais pragas não atingiriam o povo ou a região habitada pelos hebreus. Após as pragas, os egípcios ajudariam os hebreus a saírem de suas terras com a doação de prata e ouro.

Doença: úlceras seguidas de morte de primogênitos e morte de todos os rebanhos

Hipótese diagnóstica: Por ocorrer após desequilíbrio ambiental, com infestação de outros insetos e moscas e provocar úlceras, uma possibilidade é gastroenterite ou a febre tifoide.

Agente Causador: atribuído a ação divina com ligação a acúmulo de rãs mortas e infestação de moscas.

Pessoa ou populações afetadas: População egípcia e animais.

Tempo: Início no primeiro trimestre de algum ano do Período de Ramsés II (aproximadamente 1250 a.c.), final da epidemia em março do mesmo ano.

Lugar: Todo o Egito com exceção do território de Gessen (habitado pelo povo Hebreu).

Medidas sanitárias: para controlar as úlceras e morte de animais, eram realizadas

orações por pessoa determinada (Moisés) e para evitar a morte de primogênitos, ritual envolvendo dieta específica e aspersão de sangue de cordeiro nas casas. Retirada do povo hebreu do território egípcio com doação de prata e ouro.

Relações Internacionais: Conflito entre o povo dominante (egípcios) e povo oprimido (hebreus), sendo os hebreus associados às pragas e expulsos das terras egípcias.

Conceitos ainda atuais: Contar com profissionais específicos para tratar a epidemia, no caso sacerdotes e magos. Ideia de heterogeneidade na transmissão com a epidemia afetando parcela da população, de acordo com características específicas. Existência de medidas de controle para controlar a doença.

Filisteus e a peste^{3,4}

"A mão do Senhor veio contra aquela cidade e houve um grande pânico; pois feriu aos homens daquela cidade, desde o pequeno até ao grande e lhez saíram tumores". (1 Samuel 5,9)

Descrição: Os Filisteus levaram a arca da aliança e começam a morrer e serem assolados por tumores bolhosos²². Associam os ferimentos a atuação do Deus dos Israelitas e resolvem levar a arca para outras cidades a fim de diminuir a influência do Deus Yahweh. No entanto, todas as cidades que recebem a arca sofrem a epidemia. Os filisteus convocam sacerdotes e adivinhadores para decidirem o que fariam com a arca. Esses definem que devem mandar a arca de volta para os israelitas com uma oferenda em ouro em forma de bolhas e de ratos em número de 5, um para cada príncipe dos filisteus. Os filisteus relatam que o Egito tinha sofrido as pestes associadas ao povo hebreu. A arca foi enviada por vacas e sem a condução de ninguém, com os príncipes observando de longe a direção que as vacas levariam a arca. A Arca chega ao território israelita de Bete-Semes, é retirada pelos levitas e o povo sofre da epidemia e solicita que os israelitas de Quiriate-Jearim levem a arca.

Doença: morte, tumores bolhosos

Hipótese diagnóstica: Por se caracterizar por feridas bolhosas e ter uma associação com ratos poderia ser a peste bubônica.

Agente causador: a mão de Deus vinculado à arca da aliança; existe uma associação com os ratos, uma vez que ratos de ouro fazem parte da oferenda.

Pessoa: Os filisteus e os hebreus de Bete-Semes

Tempo: segunda metade do século IX a.C., duração de 7 meses

Lugar: Asdode, Gate, Ecom, Bete-Semes.

Medida sanitária:

- Mudar a arca da aliança de cidade;
- Devolver a arca com ofertas para o povo hebreu
- Enviar oferendas
- Levar a arca sem nenhuma pessoa conduzindo
- Restringir o contato com a arca a pessoas preparadas, no caso os Levitas.

Relação internacional:

- Traços de xenofobia, pela associação da peste com objeto sagrado de outro povo, bem como associação do povo causador da epidemia com outras pestes.

Conceito ainda atual: Existência de uma fonte de contaminação que leva a doença e determinação de grupo específico de profissionais para tratar com a fonte infecciosa.

Peste de Xerxes (480 a.C)⁵

“Além disso, uma praga e disenteria destruía o exército ao longo do caminho”.

(Historias 8, Heródoto)

Descrição: Escrito com algum método de pesquisa pelo pai da História, Heródoto, na oitava subdivisão de seu livro Histórias, partindo da escuta das coisas contadas, da observação dos eventos e de um julgamento das observações escutadas e analisadas o autor faz o seu relato, também realizado pelo historiador romano do século II d.C. Marcus Iunianus Iustinus, em *Historiae Philippicae* 2.13.8-12.

O rei persa Xerxes I, O Grande, Filho de Dario, após grande derrota percorre com suas tropas de Mardônio na Tessália até Helesponto em 45 dias, metade do tempo que levou para realizar o percurso inverso. Neste itinerário houve grande privação de alimento, comendo tudo o que encontrasse pelo caminho, incluindo capim, folhas e casca das árvores domésticas e silvestres e que tomaram diversos tipos de águas que os levaram a morte. As tropas sofrem uma praga e disenteria, e são abandonados os doentes em Tessália, Siris de Paiônias e na Macedônia, com recomendação de cuidados. Relata-se que eram tantos cadáveres que as estradas ficaram cheias de cadáveres e o que restou do exército de Xerxes era acompanhado de aves e outros animais de rapina.

Doença: pragas, disenteria e morte

Hipótese diagnóstica: Por ter uma alusão a má alimentação e expressar diretamente

a disenteria é possível se tratar da Shigelose, Disenteria Bacilar entre outras.

Agente causador: fome, má alimentação, falta de água e ingestão de águas inapropriadas e exaustão física.

Pessoa: Militares persas.

Tempo: Mês de setembro de 480 a.C. com duração de 45 dias.

Lugar: Grécia, entre Mardônio na Tessália até de Helesponto.

Medidas sanitárias: Retirar os enfermos da marcha e deixá-los com recomendação de serem cuidados.

Relação Internacional: Povo invasor (Persa) é alvo de pragas e disenteria associado a comportamento alimentar, ligado a medo de ser capturado pelo povo vitorioso (Grego).

Conceitos atuais: Associação de doença a má alimentação e privação de descanso.

Roma (436-433 a.C.)²³

“Os campos foram devastados e Roma esvaziada pelas sucessivas mortes”. (Tito Lívio)

Descrição: Segundo o escrito de Tito Lívio, Ab Urbe Condita, que narra a história de Roma, sucessivas epidemias assolam Roma e os territórios vizinhos. Muitas das epidemias ocorreram em áreas pantanosas.

Entre 492 e 491 a.C. Roma teme ser invadida pelos Volcos, o que não ocorre devido a uma grande peste no território dos Volcos. A fim de se proteger, Roma aumenta o número de colonos de Velitras e cria uma nova colônia em Norba, cidade fronteira ao território Volco. E, em Roma, Coriolano tenta suprimir direito dos plebeus decorrente de falta de grãos.

No período de 476 e 475 a.C há o relato de que os romanos são impedidos de ajudar os seus aliados latinos e hérnicos contra os invasores Aequi e Volcos, devido a uma grande peste causada por cólera dos deuses.

Em 462 a.C., aproveitando de uma epidemia que mata dois cônsules, se tenta aprovar um projeto de lei para limitar poderes dos cônsules, o que não é aprovado por forte discordância do prefeito de Roma, já que esse projeto favoreceria uma invasão dos Volcos. A tentativa é considerada um ataque à República.

Entre 453 a 452 a.C. é relatada a morte de rebanhos e pessoas, incluindo algumas

autoridades. Os inimigos evitam atacar Roma fragilizada pela peste. Neste período os conflitos entre facções internas na Cidade de Ardeia são piores que qualquer guerra do estrangeiro, fome ou praga.

Em 437 a.C. Roma está sofrendo de peste e fome, atacada pelos povos vizinhos e são convocados sacerdotes que realizam rituais.

Entre 433 a 432 a.C. uma epidemia assola animais e população e os romanos têm que buscar trigo no estrangeiro. Para aplacar a epidemia, os sacerdotes consultam livros proféticos e aconselham a dedicação de um templo ao Deus grego Apolo. Ocorre a interrupção de assembleias e aprovação de lei para inibir abusos políticos no período eleitoral. Ocorre a vitória dos Patrícios sobre os Plebeus nas eleições.

Doença: fome e peste

Hipótese diagnóstica: dado o histórico dos registros de epidemias nesta região mais pantanosa e a alusão a uma sazonalidade, é possível que se refira a Malária. Nesse período ainda não existia nem a teoria dos miasmas.

Agente causador: Cólera dos deuses.

Pessoa: Romanos e populações de territórios vizinhos

Tempo: 492 a 433 a.C.

Lugar: Roma e arredores

Medidas sanitárias: Convocação dos sacerdotes, consulta a livros proféticos e construção de templo ao Deus Grego Apolo.

Relações Internacionais: Aproveitamento de debilidade devido a epidemia para intensificar conflitos entre povos e reordenamento econômico com a necessidade de buscar alimento em outras regiões.

Conceitos atuais: Epidemia causa um estado de exceção. Epidemias enfraquecem a estrutura política, tentativa de golpe, de diminuição de direitos da população e de mudanças nas leis no período de epidemia. As epidemias assolam a população e os rebanhos, não afetam apenas a situação de saúde, mas a situação política e econômica. A epidemia é um período propício para a demagogia política, com políticos aproveitando da situação para obter benefícios. A doença pode afligir todos povos e classes.

4.2.2. Peste Negra (1333 a 1351)^{6,20}

“...pela violência da peste, era tão grande a multidão dos que iam morrendo dia e noite” (Giovanni Boccaccio. Decameron.)

Descrição: Foi uma Pandemia que assolou o século XIV iniciando pela Ásia central e chegou na Europa seguindo os fluxos de comércio, Rota da Seda, e se espalhou por todo o continente europeu. A doença foi devastadora, tendo sido estimados 24 milhões de mortos somente na Europa, o que correspondia, aproximadamente, a um terço da população. À época, a doença foi bem descrita, com os seguintes sinais e sintomas: a febre e os bubões que deram nome à doença, o mau hálito, as manchas pelo corpo e a irritabilidade da pele. A doença afetava a todos, no campo e nas cidades, que foram dizimadas. Entre as várias teorias de contágio, sobressaía a ideia de transmissão pelo ar e pelo toque. Surgem medidas profiláticas como a quarentena de navios, o uso de perfumes de rosas, roupas protetoras para os médicos, distanciamento dos enfermos, a fumigação dos domicílios com incenso de flores de camomila, bem como das praças e lugares públicos. As pessoas deveriam abster-se de comer galinha ou carnes gordas e azeite. Não deveriam dormir após a aurora, os banhos eram considerados perigosos e as relações sexuais, fatais. Houve lugares nos quais se estabeleceu que os doentes deveriam sair da cidade.

Doença: Peste bubônica

Agente causador: O ar e o contato com doentes

Pessoa: Toda população europeia.

Tempo: 1333 a 1351

Lugar: Pandemia englobando a Ásia Central e a Europa

Relações Internacionais: A epidemia devastou cidades e a produção, abalou a ordem social/religiosa, instalou a quarentena em navios de comércio e dizimou reinos e cidades.

Conceitos atuais: Medidas de prevenção, uso de equipamentos de proteção, distanciamento social, quarentena (de navios e pessoas), alimentação específica para doentes, saneamento do ambiente.

4.2.3. Epidemia na Idade Contemporânea

Assim como apresentado na antiguidade, vamos ilustrar a epidemia de cólera, no contexto pós revolução industrial, que foi marcante no processo de ordenamento das agências internacionais de saúde e, conseqüentemente, do Regulamento Sanitário Internacional.

Esse contexto inicia com a existência do conceito de transmissão, antes mesmo do conhecimento dos patógenos. Ou seja, existia o entendimento de que a doença era contagiosa, que correspondia a um mecanismo pelo qual a doença passaria de uma pessoa para outra, bem como contaminaria objetos.

Também no século XVII, mas não tão direcionada a medicina, temos as descrições dos microrganismos por Anton Van Leeuwenhoek, que forma o pilar para que, no século XIX, viessem a ser descritas as bactérias, tendo Robert Koch como expoente, e os avanços da microbiologia e imunologia personificados na pessoa de Louis Pasteur.

Apesar da magnitude da Pandemia da Gripe Espanhola em pleno período de Guerra Mundial, também vamos nos abster de sua caracterização, visto que ela não trouxe inovações substanciais ao controle das doenças, como quarentena, isolamento social, uso de máscaras de proteção que foram incorporadas na Peste Negra.

As ideias da revolução francesa, representadas na teoria da Medicina Social, que incorporava os determinantes sociais na causalidade das epidemias não prevalece e temos a hegemonia do entendimento inglês, que apesar de atestar a associação entre as condições de vida e a presença de doenças, propõe-se a intervir sobre alguns aspectos da vida urbana porém sem modificar a organização social e seus determinantes²⁵.

Ainda neste período, decorrentes da interação com as colônias surgem os interesses pelas doenças presentes no novo continente.

Cólera

“A cólera se estendia a quase todas as casas em que a água estava contaminada e a outras não” (John Snow).

Descrição: Realizada de forma sistemática por John Snow²⁶, considerado um dos pais da epidemiologia, sua obra descreve de forma sistemática a epidemia de Cólera que

assolou Londres, Inglaterra, nos anos de 1848-1854. O pesquisador descreve a forma de transmissão da Cólera pelo consumo de água contaminada. No seu trabalho, é identificada a fonte do surto do bairro de Soro como sendo a bomba de água pública na Broad Street, atual Broadwick Street, oriunda da captação de água realizada por uma companhia a jusante da saída de esgoto.

O autor chegou a definir a fonte de propagação e medidas de controle que envolviam a interdição da fonte propagadora e a necessidade de medidas de asseio, fervura e filtragem das águas para consumo, cozimento e fritura dos alimentos, assim como a comunicação à população dessas medidas. Nas argumentações da sua tese, Snow cita a relação da doença nos navios unicamente quando saíam ou chegavam em portos contaminados, bem como o problema do cólera nas frentes de batalha com o consumo de águas inapropriadas.

Doença: Cólera

Agente causador: Água contaminada, tendo sido identificada a fonte do surto do bairro de Soro como sendo a bomba de água pública na Broad Street e a associação da captação de água a jusante da saída de esgoto.

Pessoa: População que consumia água contaminada.

Tempo: 1848-1854

Lugar: Londres, Inglaterra

Medidas sanitárias: interdição da fonte propagadora e necessidade de medidas de asseio, ferver e filtrar as águas para consumo, cozimento e fritura dos alimentos e comunicação da população.

Relações Internacionais: A Inglaterra era um dos carros chefes da revolução industrial e os impactos econômicos da doença afetavam continuamente sua produção.

Conceitos atuais: Fontes de transmissão das doenças, distribuição heterogênea da doença, Medição de risco, caracterização em pessoa, tempo e lugar, definição de medida de controle. Importância do Cólera e das doenças transmissíveis.

4.3 Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde

Esta seção pretende fazer uma contextualização histórica da formação da OPAS e da OMS, a partir das conferências sanitárias internacionais.

A Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde trabalha com os países para melhorar a saúde e a qualidade de vida de suas populações. O organismo internacional oferece cooperação técnica em saúde a seus

países membros; combate doenças transmissíveis e doenças crônicas não transmissíveis, bem como suas causas; e fortalece os sistemas de saúde e de resposta ante emergências e desastres. A missão da OPAS é liderar esforços colaborativos estratégicos entre os Estados Membros e outros aliados, para promover a equidade em saúde, combater doenças, melhorar a qualidade de vida e elevar a expectativa de vida dos povos das Américas.

O foco de uma cooperação técnica internacional é o desenvolvimento de capacidades, de instituições e de indivíduos para a geração de mudanças e transformações socioeconômicas⁷.

A primeira Conferência Sanitária Internacional se deu em 19 de dezembro de 1851, em Paris. Não por acaso, no mesmo ano da primeira Exposição Internacional em Londres, apontando um vínculo entre progresso e saúde²⁷. O principal objeto da reunião era a necessidade de reduzir a duração das medidas de quarentena, consideradas desmedidas e nocivas para o comércio²⁸. Anexo a essa primeira conferência, redigiu-se um Regulamento Sanitário Internacional que contou com baixa adesão, assinado em 16 de janeiro de 1852 unicamente pela França, Sardenha, Portugal, Turquia e Toscana²⁹.

A segunda Conferência ocorreu em 1859 também em Paris, nunca tendo sido ratificada. A terceira Conferência realizou-se em Constantinopla em 1866 e a quarta, em Viena no ano de 1874. Até a quarta conferência as epidemias próprias do continente americano haviam sido negligenciadas, com enfoque eurocêntrico. Sendo a quinta Conferência Sanitária Internacional a primeira a se realizar no continente americano, ocorrendo em Washington em 1881¹⁰.

Foi durante a quinta Conferência que o pesquisador Carlos Finlay, delegado especial de Espanha, representando Cuba e Porto Rico, apresentou sua teoria sobre a transmissão da febre amarela por um vetor, o mosquito *Culex cubensis* atualmente *Aedes aegypti*⁸. Sua hipótese só foi considerada plenamente demonstrada vinte anos depois²⁷, mas trouxe a discussão da epidemia de maior transcendência do continente americano. Apenas na Conferência Sanitária Internacional de 1903 seria considerado como fato científico o papel do *Stegomyia fasciata* (atualmente *Aedes aegypti*) na transmissão da febre amarela²⁷. Nessa mesma conferência seria também estabelecido o papel do rato na transmissão da peste.

Ocorreram sucessivas Conferências Internacionais de Saúde, 1883 em Roma, 1892 em Veneza, 1893 em Dresden, 1894 em Paris, 1897 em Veneza com foco na

medicina preventiva. Em 1907 em Roma ocorreu a Conferência Internacional de Saúde com a repactuação das convenções anteriores. Foi nessa Conferência que um grupo de países basicamente europeus, contando com a participação dos Estados Unidos, assinaram a criação da Office International d'Hygiene Publique (Oficina Internacional de Saúde Pública), com sede em Paris.

Em paralelo a este movimento global, durante a primeira Conferência Internacional dos Estados Americanos, realizada em Washington no ano de 1890, foi fundada a Oficina Internacional das Repúblicas Americanas, hoje Organização dos Estados Americanos, com enfoque nas relações comerciais. Na segunda Conferência Internacional dos Estados Americanos, realizada na Cidade do México, entre outubro de 1901 e janeiro de 1902, se recomendou a convocação de uma “convenção geral dos representantes das oficinas de saúde das Repúblicas Americanas” juntamente com a designação de uma junta permanente denominada “Oficina Sanitária Internacional” com sede em Washington. Fruto da convocação houve a primeira Convenção Sanitária Internacional entre 2 e 5 de dezembro de 1902, sendo fundada a *International Sanitary Office of the American Republics* (Oficina/Repartição Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas)¹⁰, denominada a partir de 1920 como Oficina/Repartição de Saúde Pan-americana, com base em Washington (DC). Algumas décadas depois tornou-se a Oficina/Repartição Sanitária Pan-Americana e a partir de 1959 recebeu o nome atual de Organização Pan-Americana da Saúde (OPS, 1992; Cueto, 2004a)³⁰, sendo a agência de saúde pública internacional mais antiga do mundo.

A OPAS, desde sua fundação em 1902 e até incorporar a natureza de representação da OMS para a região das Américas em 1949, realizou doze Conferências Sanitárias Pan-Americanas, chamadas de Convenção Sanitária Internacional das Republicas Americanas até a quarta convenção, em 1909, quando passou a ser nominada de Conferência Sanitária Internacional (das Repúblicas Americanas) e adotando o nome de Conferência Sanitária Pan-americana a partir da sua sétima edição no ano de 1924. A constância na realização de suas conferências é sinal da solidez e sustentabilidade da instituição³⁰.

No período de 1920 a 1942, fruto do Tratado de Versalhes, de 28 de julho de 1919, os países vencedores da primeira guerra mundial criam a Liga das Nações (LN) que, como consta no seu artigo 23, “esforçar-se-á por tomar medidas em questões de interesse internacional para a prevenção e controle de doenças”. Já na segunda

sessão da LN, em fevereiro de 1920, com os países do leste europeu, Polônia e Rússia sofrendo epidemias de tifo, de febres recorrentes e cólera, é instituída a Comissão de Epidemias da Liga das Nações. Com as importantes atividades da Comissão de Epidemias, durante a quarta sessão da Liga das Nações, em setembro de 1923 é instituída a Organização de Saúde da Liga das Nações (LNHO, sigla em inglês)³¹. É importante ressaltar que os Estados Unidos não fizeram parte da Liga das Nações, sendo o Brasil o único país das Américas a pertencer a LN, se retirando em 1926.

Com o pós guerra em 1945 é fundada a Nações Unidas e, três anos mais tarde, a Organização Mundial da Saúde (1948), com a OPAS assumindo uma dupla natureza: Permanecendo como uma organização própria e sendo a representação da OMS para as américas. O quadro 1, abaixo, apresenta os marcos na história da formação dessas instituições.

Quadro 1: Apresentação dos marcos históricos na construção da OPAS e da OMS.

1851 - 1º Conferência Internacional de Saúde, em Paris (regulamento de baixa adesão)
1859 - 2º Conferência Internacional de Saúde, em Paris
1866 - 3º Conferência Internacional de Saúde, em Constantinopla
1874 - 4º Conferência Internacional de Saúde, em Viena
1881 - 5º Conferência Internacional de Saúde, em Washington
1885 - 6º Conferência Internacional de Saúde, em Roma
1890 - 1º Conferência internacional dos Estados Americanos - Fundação da Oficina Internacional das Repúblicas Americanas, atual Organização dos Estados Americanos
1892 - 7º Conferência Internacional de Saúde (Veneza), medidas sanitárias contra o cólera
1893 - 8º Conferência Internacional de Saúde, em Dresden
1894 - 9º Conferência Internacional de Saúde, em Paris
1897 - 10º Conferência Sanitária Internacional (Veneza), medidas sanitárias contra a peste
1902 - 1º Convenção Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas e fundação da Oficina Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas, atual OPAS (Washington)
1903 - 11º Conferência Internacional de Saúde, Paris – repactuação das conferências anteriores
1905 - 2º Convenção Sanitária internacional das Repúblicas Americanas, quarentena e medidas de controle executadas pelos países, transmissão vetorial da febre amarela (Washington)
1907 - Acordo de Roma com a Fundação da "Oficina/Repartição Internacional para a Saúde Pública" (Office International d'Hygiene Publique - OIHP), sede Londres
1907 - 3º Convenção Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas, oficializa relações com a OIHP. (Cidade do México)
1910 - 4º Conferência Sanitária Internacional (das Repúblicas Americanas) (não mais Convenção Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas), vacinação de varíola, campanhas de controle de malária e tuberculose (San José/Costa Rica)
1911 - 5º Conferência Sanitária Internacional (das Repúblicas Americanas), representação pelas autoridades de saúde (Santiago)

1919 - Fundação da Liga das Nações
 1920 - Fundação da Comissão de Epidemias da Liga das Nações
 1920 - 6º Conferência Sanitária Internacional (das Repúblicas Americanas), representação pelas autoridades de saúde (Montevideu)
 1923 - Mudança do nome da Oficina Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas para Oficina Sanitária Pan-americana (Atual OPAS)
 1923 - Instituída a Organização de Saúde da Liga das Nações (não mais Comissão de Epidemiologia da Liga das Nações)
 1924 - 7º Conferência Sanitária Pan-Americana (não mais chamada de Conferência Sanitária Internacional (das Repúblicas Americanas)) em Havana, aprova o Código Sanitário Pan-Americano
 1926 - Conferência Sanitária Internacional em Paris, solicita que a Oficina Sanitária Pan-americana atue como organização regional para coletânea de dados para a OIHP
 1926 - 1º Conferência Pan-americana de Diretores de Saúde (reunião entres as Conferência Sanitária Pan-Americana).
 1927 - 8º Conferência Sanitária Pan-Americana (intercâmbio de informações com a OIHP.
 1929 - 1º Reunião do Conselho Diretivo da Oficina Sanitária Pan-americana
 1931 - 2º Conferência Pan-americana de Diretores de Saúde, ampliação de temas (nutrição, câncer)
 1934 - 9º Conferência Sanitária Pan-Americana, aprova os estatutos
 1936 - 3º Conferência Pan-americana de Diretores de Saúde
 1938 - 10º Conferência Sanitária Pan-Americana (amplia o financiamento e pessoal)
 1940 - Reunião do Conselho Diretivo da Oficina Sanitária Pan-americana e 4º Conferência Pan-americana de Diretores de Saúde
 1942 - 11º Conferência Sanitária Pan-Americana – Rio de Janeiro
 1945 - Conferência das Nações Unidas sobre Organismos Internacionais - Fundação das Nações Unidas (São Francisco /EUA)
 1946 - Reunião de Comitê de Preparação para Conferência Sanitária Internacional (Representantes da Oficina Sanitária Pan-americana, da Office International d'Hygiene Publique (OIHP), da Organização de Saúde da Liga das Nações e da Divisão de Higiene da Administração de Socorro e Reabilitação das Nações Unidas.
 1946 - Conferência Internacional de Saúde e redação da constituição da OMS
 1947 - 12º Conferência Sanitária Pan-Americana (Constituição estrutural e renomeia como Organização Sanitária Pan-americana (OSP), não mais Oficina/repartição) (Buenos Aires)
 1948 - 1º Assembleia mundial de Saúde (Genebra) – ratificação da constituição da OMS e dupla natureza da OSP
 1948 - Reunião do Conselho Diretivo da Oficina Sanitária Pan-americana (México) aprova dupla natureza da OSP
 1949 - 2º Assembleia mundial de Saúde (Genebra) – A OSP é Oficina Regional da OMS para as Américas e permanência da identidade de OSP.
 1950 - 13º Conferência Sanitária Pan-Americana (República Dominicana), estabelece a sede definitivamente em Washington e fim das Conferência Pan-americana de Diretores de Saúde, função do Conselho Diretivo da OSP.

4.3.1 Organização Mundial de Saúde (OMS)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) é uma agência internacional especializada em saúde, subordinada à Organização das Nações Unidas sediada em Genebra, na Suíça. Ela é composta por 194 estados membros e dois membros associados.

Os Estados Membro da organização reúnem-se no marco da Assembleia Mundial da Saúde (AMS), realizada anualmente, com o objetivo de estabelecer a política geral da Organização, aprovar seu orçamento e, a cada cinco anos, para eleger o Diretor- Geral. Além disso, os trabalhos da OMS nas mais diversas áreas da saúde global, conduzidos pelos seus órgãos técnicos, com a colaboração de

instituições dos Estados Membros, têm continuidade ao longo de todo o ano. Os órgãos de governança da OMS são o Conselho Executivo (EB), a Assembleia Mundial da Saúde (AMS) e o Comitê de Programa, Orçamento e Administração (PBAC).

Conselho Executivo (Executive Board - EB)

O EB é composto por 34 estados membros eleitos pela AMS para um mandato de três anos, reunindo-se duas vezes ao ano. A principal reunião ocorre todo mês de janeiro e tem como objetivo decidir a agenda para a Assembleia Mundial de Saúde, adotando resoluções e outros documentos que serão submetidas a este fórum. A segunda reunião do ano ocorre no mês de maio, imediatamente após a AMS, para tratar de assuntos de caráter administrativo.

Comitê de Programa, Orçamento e Administração do Conselho Executivo (PBAC)

O PBAC é composto por 14 estados membros, dois por região, escolhidos entre os países que compõem o EB. O PBAC reúne-se duas vezes ao ano, podendo convocar reuniões extraordinárias para tratar de assuntos considerados de urgência ou de grande relevância. O PBAC revisa e faz sugestões/recomendações ao EB sobre os assuntos financeiros e administrativos sob a ótica do planejamento, monitoramento e avaliação.

Assembleia Mundial da Saúde (AMS)

A Assembleia é o maior órgão decisório da OMS e reúne-se anualmente, todo mês de maio. Sua principal função é determinar as políticas da organização, considerando os informes do Conselho Executivo. A AMS analisa, revisa e aprova as Resoluções e outros documentos submetidos pelo EB, quando obtido consenso entre os Estados Membros. A Presidência de cada AMS é definida entre os Estados Membros, cabendo aos membros do corpo dirigente da OMS o papel de Secretariado.

4.3.2 Organização Pan-americana de Saúde (OPAS)

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) é uma organização especializada em saúde que faz parte do sistema da Organização dos Estados Americanos (OEA) e do sistema das Nações Unidas (ONU), atuando como escritório regional para as Américas da Organização Mundial de Saúde (OMS). Os órgãos de governança da organização são: a Conferência Sanitária Pan-Americana, o Comitê Executivo (CE), o Conselho Diretor (CD) e o Subcomitê de Programa, Orçamento e Administração (SBPA).

A OPAS exerce papel fundamental na melhoria de políticas e serviços públicos de saúde por meio da transferência de tecnologia e da difusão do conhecimento acumulado e de experiências produzidas nos países membros, um trabalho de cooperação internacional promovido por técnicos e cientistas vinculados à OPAS/OMS e consultores especializados em epidemiologia, saúde e ambiente, recursos humanos, comunicação, serviços, controle de zoonoses, medicamentos, promoção da saúde, entre outros.

Conferência Sanitária Pan-Americana

É autoridade máxima da Organização e se reúne a cada cinco anos, com o objetivo de determinar suas políticas gerais. A 29ª Conferência ocorreu em 2017.

Comitê Executivo (CE)

O CE é composto por nove Estados Membros, eleitos durante a sessão do Conselho Diretor, para exercerem um mandato de três anos. O Comitê se reúne duas vezes por ano, funcionando como um grupo de trabalho da Conferência e do Conselho, atuando na elaboração da agenda do CD.

Conselho Diretor (CD)

Reúne-se uma vez por ano, com a representação de todos os países da região, atuando em nome da Conferência no intervalo de suas sessões. O CD analisa, revisa e aprova as Resoluções e outros documentos submetidos pelo CE, quando obtido consenso entre os Estados Membros. A Presidência de cada CD é definida entre os Estados Membros, cabendo aos membros do corpo dirigente da OPAS o papel de Secretariado.

Subcomitê de Programa, Orçamento e Administração (SPBA)

O SPBA é um órgão consultivo auxiliar do Comitê Executivo, responsável por analisar e fazer recomendações ao CE sobre aspectos relacionados a programas, orçamento e administração da Organização. É composto por sete estados membros, sendo quatro com mandatos simultâneos aos dos membros do CE e três designados anualmente pela Diretora da OPAS, em consulta com o presidente do CE. O SPBA realiza ao menos uma sessão ao ano, com convocação de reuniões extraordinárias nos anos em que é discutido o orçamento da Organização.

4.4 Regulamento Sanitário Internacional (RSI)

O Regulamento Sanitário internacional é um instrumento de colaboração voltado para evitar a disseminação de epidemias entre os países e de mitigação dos seus impactos em nível global.

As primeiras versões de tratados sanitários tinham caráter restritivo, policial e, até certo ponto, punitivo. A Primeira Conferência Sanitária Internacional, ocorrida no ano de 1851 em Paris, propôs um Regulamento, que foi assinado em 16 de janeiro de 1852 unicamente pela França, Sardenha, Portugal, Turquia e Toscana.

Como marco de maior relevância temos a VII Conferência Sanitária Pan-Americana, que ocorreu 14 de novembro de 1924 em Havana, Cuba, quando 21 países americanos assinaram o Código Sanitário Pan-Americano, que visava a prevenção da propagação internacional de infecções transmissíveis; a cooperação e o intercâmbio de informações entre os países, para melhorar a saúde pública e combater doenças, além da padronização de medidas adotadas nos pontos de entrada. Foi o Código Sanitário Pan-Americano que serviu de base para o primeiro Regulamento Sanitário Internacional, incorporado em 1951 pela Organização Mundial da Saúde. Este RSI tinha como propósito o monitoramento e controle de seis doenças infecciosas graves: cólera, peste, febre amarela, varíola, febre recorrente e tifo. Em 1969 o regulamento sofreu sua primeira revisão, e em 1973 novas alterações foram feitas com a inclusão de medidas adicionais para o controle da cólera. Em 1981, foram excluídas as exigências em relação à varíola cuja erradicação havia sido declarada do mundo pela 33ª Assembleia Mundial da Saúde em 8 de maio de 1980.

A última revisão do Regulamento Sanitário Internacional iniciou-se em 1995 e foi finalizada em maio de 2005, entrando em vigor no plano jurídico internacional em 15 de junho de 2007, pela 58ª Assembleia Mundial da Saúde através da Resolução WHA58.3. No Brasil, o Congresso Nacional aprovou o texto revisado do Regulamento Sanitário Internacional, por meio do Decreto Legislativo nº 395, de 9 de julho de 2009, que por sua vez foi promulgado pelo Decreto Nº 10.212, de 30 de janeiro de 2020, da Presidência da República.

A atual versão do RSI já não consta de uma lista de doenças, mas sim do conceito de emergência de saúde pública que incorpora além de qualquer doença com risco de disseminação, os desastres, além de riscos de origem intencional (terrorismo). O objetivo do RSI gira em torno de descobrir, reduzir ou eliminar as fontes de disseminação de infecções no local de origem e outras situações de risco que possam

gerar doença.

Atualmente, o Regulamento Sanitário Internacional, de 2005, estabelece o conceito de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e temos como elementos definidores para sua declaração não apenas a gravidade e letalidade das ocorrências, mas o seu potencial alcance internacional. Neste contexto já foram declaradas 5 ESPII. A primeira em abril de 2009 devido H1N1, declarada Pandemia em junho de 2009. Em maio de 2014 o risco de propagação do poliovírus devido ao comprometimento da vacinação na Guerra da Síria é a segunda declaração. A terceira declaração é o Ebola em agosto de 2014. A quarta foi devido ao Zika vírus (2016) e a última a pandemia do SARS-CoV-2 (2020).

Quadro 2: Apresentação dos marcos históricos na construção do RSI.

1851 - Primeira Conferência Internacional de Saúde, em Paris (regulamento de baixa adesão) 1892 - Conferência Sanitária Internacional (Veneza) medidas sanitárias contra o cólera 1897 - Conferência Sanitária Internacional (Veneza) medidas sanitárias contra a peste 1903 - Conferência Sanitária Internacional (Washington) métodos de controle da Febre Amarela. 1924 - Primeiro Código Sanitário Pan-Americano, VII Conferência Sanitária Pan-Americana (Havana), 1929 - Oficina Sanitária Pan-americana estabelece fluxo de recebimento de telegramas de informação dos Diretores Sanitários dos países de doenças “quarentenáveis” e de medidas implementadas para impedir a propagação e problemas de comércio internacional, com periodicidade mensal e até semanal. Também se comunicava a OIHP e para a Organização de Saúde da Liga das Nações ¹⁰ . 1951 - Primeiro Regulamento Sanitário Internacional da Organização Mundial da Saúde 1981 – Revisão do RSI com exclusão das exigências em relação à varíola cuja erradicação havia sido declarada 33 Assembléia Mundial da Saúde. . 2005 - Quinto Regulamento Sanitário Internacional da Organização Mundial da Saúde.

O artigo 6 do RSI, que versa sobre a notificação de ESPII, apresenta a necessidade de cada Estado Parte avaliar os eventos que ocorrem dentro de seu território, utilizando o instrumento de decisão do Anexo 2 do RSI, “Instrumento de decisão para a avaliação e notificação de eventos que possam constituir emergência de saúde pública de importância internacional”. Uma vez detectados eventos que possam se constituir numa ESPII, o Estado Parte tem vinte e quatro horas para notificar a OMS.

Quadro 3: Esquema de tomada de decisão para a notificação via Regulamento Sanitário Internacional (RSI) da epidemia de febre amarela, segundo anexo 2 do RSI.

Observação: As partes destacadas em negrito evidenciam o cumprimento por parte da epidemia de Febre Amarela.

Um evento que envolva as doenças a seguir sempre deverá conduzir à utilização do algoritmo, porque elas demonstraram capacidade de causar um grave impacto sobre a saúde pública e são de rápida propagação internacional:

- Cólera
- Peste pneumônica
- **Febre amarela**
- Febres hemorrágicas virais (Ebola, Lassa, Marburg)

- Febre do Nilo Ocidental
- Outras doenças de particular interesse nacional ou regional, por exemplo, dengue, febre do Vale de Rift, e doença meningocócica.

I. O IMPACTO DO EVENTO SOBRE A SAÚDE PÚBLICA É GRAVE?

Resposta: Sim

1. O número de casos e/ou o número de óbitos para esse tipo de evento é alto para aquele local, tempo ou população determinados?

Sim

2. O evento tem potencial para causar um grande impacto sobre a saúde pública?

- **Evento causado por um agente patogênico com alto potencial de causar epidemias (patogenicidade do agente, alta letalidade, múltiplas vias de transmissão ou portadores são).**
- Indicação de fracasso terapêutico (resistência a antibióticos nova ou emergente, ineficácia da vacina, resistência ou ineficácia de antídotos).
- **O evento representa um risco significativo para a saúde pública, ainda que nenhum ou poucos casos humanos tenham sido identificados.**
- Relato de casos entre profissionais de saúde.
- **A população de risco é especialmente vulnerável (refugiados, baixo nível de imunização, crianças, idosos, baixa imunidade, desnutridos, etc.).**
- Fatores concomitantes que possam impedir ou retardar a resposta de saúde pública (catástrofes naturais, conflitos armados, condições meteorológicas desfavoráveis, múltiplos focos no Estado Parte).
- **Evento em área de alta densidade populacional.**
- Propagação de materiais tóxicos, infecciosos ou de por alguma outra razão perigosos, de origem natural ou não, que tenham contaminado ou tenham o potencial de contaminar uma população e/ou uma grande área geográfica.

3. É necessária assistência externa para detectar, investigar, responder e controlar o evento atual ou evitar novos casos?

Resposta: Sim

- Recursos humanos, financeiros, materiais ou técnicos inadequados – em particular: Capacidade laboratorial ou epidemiológica insuficiente para investigar o evento (equipamento, pessoal, recursos financeiros)
- **Antídotos, medicamentos e/ou vacinas e/ou equipamento de proteção, equipamento de descontaminação ou equipamento de apoio insuficientes para atender às necessidades estimadas**
- Sistema de vigilância existente inadequado para a detectar casos novos rapidamente.

O IMPACTO DO EVENTO SOBRE A SAÚDE PÚBLICA É GRAVE? Responda “sim” caso você tiver respondido “sim” às questões 1, 2 ou 3 acima

II. O EVENTO É INCOMUM OU INESPERADO?

4. O evento é incomum?

- O evento é causado por um agente desconhecido, ou a fonte, veículo ou via de transmissão são incomuns ou desconhecidos.
- A evolução dos casos é mais severa do que o esperado (incluindo morbidade ou mortalidade) ou os sintomas apresentados são incomuns.
- **A ocorrência do evento em si é incomum para a região, estação ou população.**

5. O evento é inesperado sob a perspectiva de saúde pública?

Evento causado por uma doença ou agente que já tenha sido eliminado ou erradicado do Estado Parte ou que não tenha sido notificado anteriormente.

O EVENTO É INCOMUM OU INESPERADO? Responda “sim” caso você tiver respondido “sim” às perguntas 4 ou 5 acima

III. HÁ RISCO SIGNIFICATIVO DE PROPAGAÇÃO INTERNACIONAL?

6. Há evidências de correlação epidemiológica com eventos similares em outros Estados?

Sim

7. Existe algum fator que deva alertar sobre potencial deslocamento transfronteiriço do agente, veículo ou hospedeiro?

- Quando houver evidências de propagação local, um caso índice (ou outros casos relacionados) com antecedente, no mês anterior, de: – viagem internacional (ou o tempo equivalente ao período de incubação, caso o agente patogênico for conhecido) – participação em encontro internacional (peregrinação, evento esportivo, conferência, etc.) – contato próximo com viajante internacional ou com população altamente móvel.
- Evento causado por uma contaminação ambiental com potencial de propagação através de fronteiras internacionais.
- **Evento em área de tráfego internacional intenso, com capacidade limitada de controle sanitário, de detecção ambiental ou de descontaminação.**

HÁ RISCO SIGNIFICATIVO DE PROPAGAÇÃO INTERNACIONAL? Responda “sim” caso você tiver respondido “sim” às perguntas 6 ou 7 acima.

IV. HÁ RISCO SIGNIFICATIVO DE RESTRIÇÕES AO COMÉRCIO OU VIAGENS INTERNACIONAIS?

Resposta: Sim

8. Eventos similares no passado resultaram em restrições internacionais ao comércio e/ou viagens?

Sim

9. Sabe-se ou suspeita-se que a fonte seja um produto alimentar, água ou qualquer outra mercadoria que possa estar contaminada e que tenha sido exportada para outros Estados ou importada de outros Estados?

Não

10. O evento ocorreu em associação com um encontro internacional ou em área de intenso turismo internacional?

Não

11. O evento gerou pedidos de maiores informações por parte de autoridades estrangeiras ou meios de comunicação internacionais?

Sim

HÁ RISCO SIGNIFICATIVO DE RESTRIÇÕES AO COMÉRCIO OU VIAGENS INTERNACIONAIS?

Responda “sim” caso tiver respondido “sim” às perguntas 8, 9, 10 ou 11 acima.

5- RESULTADOS:

A resposta da OPAS passou pela instalação de uma Sala de Situação, com comunicação semanal entre a representação da OPAS no Brasil, a sua sede e a Secretaria Executiva do MS.

Em relação ao fortalecimento das capacidades, foram realizadas diversas capacitações, se destacando as capacitações em vigilância de Epizootias, entomoviológica e manejo clínico. A implementação de avaliação externa do diagnóstico molecular dos laboratórios de referência nacional para FA e a capacitação de referências de diagnósticos de imuno-histoquímica foram ganhos substanciais no fortalecimento das capacidades do País e da região das Américas.

As atividades da OPAS incorporaram a aquisição de Insumos estratégicos que, juntas com a UNICEF, facilitaram a aquisição de vacinas. Aliado a isso, a OPAS apoiou a tomada de decisão de fracionamento e embasou o País na mudança do esquema nacional de vacinação para a adoção de recomendação da OMS de dose única e fim do reforço a cada 10 anos.

Apesar da OPAS ressaltar que, por se tratar de uma epidemia silvestre, o conceito de imunidade de rebanho não se aplicava e apontar para a necessidade de garantir uma cobertura vacinal de 100% das populações mais vulneráveis, como as comunidades e trabalhadores rurais das zonas afetadas, se percebe uma baixa incorporação da relevância de conceitos sociais e culturais nas linhas de cooperação.

A realização de uma Avaliação Pós evento em Minas Gerais foi um instrumento importante para sistematizar as lições aprendidas e garantir o aperfeiçoamento das futuras respostas a epidemias, mitigando seus impactos.

Nesse contexto, a OPAS apoiou a significativa criação de evidências científicas. O apoio direto e indireto da OPAS no campo da vigilância genômica para as ações de pesquisa em Febre Amarela no Brasil, entre 2016 e 2018, colaborou para a elaboração dos artigos científicos indicados logo abaixo. Alguns desses, que contam com nossa autoria e coautoria, são reproduzidos mais a seguir na presente tese, que segue o modelo de apresentar considerável parcela de seus resultados em formato de artigos.

1. *Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential*: A pesquisa utilizou uma estratégia de vigilância genômica em tempo real em conjunto com abordagens epidemiológicas e espaciais para caracterizar a

reemergência de VFA no Brasil em 2016. As análises dos casos de VFA em conjunto com os genomas gerados revelaram a fase inicial da transmissão silvestre do VFA e a dispersão espacial para áreas anteriormente livres do vírus, seguida por um aumento da propagação viral para seres humanos no final de 2016. Os resultados estabeleceram uma estrutura para monitorar a transmissão de VFA em tempo real, que por sua vez, contribuirá para uma estratégia global para eliminar futuras epidemias do VFA.

2. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016-2019:

O ressurgimento do vírus da febre amarela (VFA) no Brasil em 2012, fez com que a OPAS, junto com pesquisadores aqui referenciados, tivessem sérias preocupações devido à rápida disseminação do vírus na região sudeste. Para melhor entender a diversidade genética viral e a dinâmica de transmissão do VFA durante o surto no sudeste do Brasil, foram gerados 18 genomas completos oriundos de primatas não humanos (NHPs) e casos de infecção humana dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro. Os genomas gerados de VFA revelaram a data, a origem e as rotas prováveis de transmissão e dispersão de VFA durante um dos maiores surtos já registrados no Brasil. Foi demonstrado que, durante a recente epidemia, o VFA foi reintroduzido de Minas Gerais para os estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro várias vezes entre 2016 e 2019. As análises dos genomas também possibilitaram a identificação de um corredor de propagação do VFA de Minas Gerais, em duas ondas, uma para o Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia, e outra para São Paulo. Os resultados reforçaram a ideia de que estratégias contínuas de vigilância genômica, entre a pesquisa e os órgãos de vigilância em saúde, podem fornecer informações sobre a diversidade genética e a dinâmica de transmissão de vírus emergentes e reemergentes, que, por sua vez, podem auxiliar no entendimento de epidemias causadas por arbovírus.

3. *Genomic Surveillance of Yellow Fever Virus Epizootic in São Paulo, Brazil, 2016 – 2018:*

A OPAS também contribuiu indiretamente com a vigilância do VFA São Paulo (SP), um estado densamente habitado do sudeste do Brasil e que contém a quarta cidade mais populosa do mundo, e que sofreu o maior surto do vírus da febre amarela (VFA) em décadas. O VFA normalmente não circula extensivamente no estado, por isso a maioria

das pessoas não estavam vacinadas quando o surto começou. A vigilância em primatas não humanos (NHPs) (que correspondeu a maior parte da ESP em São Paulo) é importante para determinar a magnitude e a extensão geográfica de uma epizootia, ajudando, assim, a avaliar o risco de transmissão do VFA para humanos. Os dados de NHPs infectados de São Paulo forneceram informações mais precisas sobre a propagação do VFA do que quando utilizamos dados de casos humanos isolados. Para contextualizar casos humanos, identificar focos epizooticos e descobrir a taxa e a direção da disseminação do VFA em SP, foram gerados e analisados dados genômicos do vírus e dados de casos de epizootia em NHP do estado. Foi vista a ocorrência de três fases espacialmente distintas do surto em SP, antes de fevereiro de 2018. Os 51 novos genomas do vírus a partir de casos positivos para VFA foram identificados em 23 diferentes municípios de SP, principalmente em amostras de NHP, entre outubro de 2016 e janeiro de 2018. Apesar de ter ocorrido uma heterogeneidade substancial na velocidade de dispersão das linhagens entre os ramos filogenéticos, as análises fitogeográficas contínuas dos genomas de VFA gerados sugerem que as linhagens de VFA se espalharam no estado de SP a uma taxa média de aproximadamente 1 km por dia durante todas as fases do surto. As linhagens virais da primeira fase epizootica do norte de SP se dispersaram posteriormente para o sul do estado, causando a segunda e a terceira fase epizootica. Isso alterou a nossa compreensão de como o VFA foi introduzido no sul do estado, uma região densamente povoada. Os resultados evidenciaram a transmissão silv da febre amarela em regiões de floresta altamente fragmentada no estado de SP e destacaram a importância da vigilância contínua de patógenos zoonóticos em espécies sentinelas.

4. Yellow fever transmission in non-human primates, Bahia, northeastern Brazil:

Em 2016, entre as áreas afetadas pelo VFA, o estado da Bahia, situado na região nordeste do Brasil, foi a única região sem casos humanos autóctones. A OPAS também contribuiu para a investigação da epidemiologia molecular do VFA em NHP na Bahia e discussão de quais fatores podem ter impedido os casos em humanos. Foram sequenciadas 47 amostras de tecido positivas para VFA de epizootias em NHP para gerando 41 sequencias parciais 8 novos genomas de VFA. A análise evolutiva revelou que os genomas do VFA formaram dois grupos filogenéticos distintos e bem suportados, provavelmente originados de uma introdução do estado de Minas Gerais, embora uma origem do estado do Espírito Santo também seja possível. Os resultados

apoiam a hipótese de duas introduções independentes do VFA SA-I e a eficácia das ações tomadas pela equipe de vigilância epidemiológica do estado para impedir casos em humanos.

5.1 Primeiro manuscrito (Anexo 7)

Título: O APAGAR DA MAIOR EPIDEMIA DE FEBRE AMARELA SILVESTRE E A COOPERAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE DURANTE A EMERGÊNCIA DE COVID-19

Autores: Carlos Frederico Campelo de Albuquerque e Melo, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Luiz Carlos Júnior Alcantara e Wildo Navegantes de Araújo

O Brasil está vivendo a maior epidemia de Febre Amarela silvestre, a transmissão atingiu números de casos historicamente elevados (2.114 casos) nos anos de 2016 a 2018, concentrados na região extra-amazônica (2.104 casos), mais de quatro vezes a soma de todos os casos dos 20 anos anteriores. Sendo a Febre Amarela o típico exemplo de uma epidemia multimodal, consideramos este período apenas como as duas ondas que marcam o pico de uma epidemia que se iniciou no Brasil em 2014, na região Sudeste do país, e se alastra até os dias atuais na região Sul¹.

A epidemia foi marcada pela persistência da transmissão do vírus em Primatas Não Humanos (PNH) inclusive nos períodos de baixa sazonalidade e atingiu áreas anteriormente consideradas sem risco, como os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e o leste do estado de São Paulo, ampliando o território com recomendação de vacinação antiamarílica, com conseqüente acréscimo de demanda por vacina de 30.000.000 de doses. Atualmente a recomendação de vacinação se estendeu a todo o território nacional. A transmissão de febre amarela foi tão intensa que foram reportados casos exportados do Brasil na França, na Holanda, na Romênia, na Suíça, na Argentina e no Chile².

Somado a este cenário, o Instituto Evandro Chagas da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde reportou durante esta epidemia a detecção do vírus da Febre Amarela (VFA) em mosquitos *Aedes albopictus*, em Minas Gerais, que já tem sua competência vetorial comprovada e alertado como o vetor capaz de fazer a ponte

entre a transmissão silvestre e urbana, ampliando o risco real de reurbanização da Febre Amarela^{3,4}.

Neste contexto, este relato tem como objetivo apresentar as estratégias de cooperação técnica da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) no intuito de favorecer o entendimento de modelos de cooperação técnica internacional em saúde. Como metodologia para a construção deste relatório foi feita uma revisão integrativa das ações de cooperação da OPAS no enfrentamento da Epidemia de febre Amarela de 2016 a 2020.

A OPAS no Brasil teve um papel central na condução técnica da emergência de Febre Amarela, contribuindo com o Ministério da Saúde (MS) e com grupos de pesquisa parceiros do MS na resposta nacional e na preparação dos países da região, com participação direta de suas equipes especializadas em campo, apoiando intervenções em diversos eixos da resposta. A OPAS propiciou a interlocução de diversos gestores da saúde e contribuiu com a produção de conhecimentos sobre a transmissão da Febre Amarela⁵.

A resposta a esta emergência em saúde congregou a expertise de cientistas de diferentes campos disciplinares envolvendo aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos, laboratorial e políticas públicas, configurando uma equipe multidisciplinar e pluri-institucional. Cabe ressaltar que a capacidade instalada de pesquisa no Brasil foi decisiva para garantir a resposta, com destaque para o Instituto Evandro Chagas e a Fiocruz que são órgãos federais que tem como missão produzir, disseminar e compartilhar conhecimentos e tecnologias que contribuam para a promoção da saúde e da qualidade de vida da população brasileira. Além da geração de conhecimento, a Fiocruz também é responsável pela produção de imunobiológicos e testes diagnóstico. A cooperação técnica no enfrentamento da Febre Amarela está historicamente registrada na gênese da Organização Pan-Americana da Saúde, que desde sua criação em 1902, com o nome de Oficina Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas, defende a importância do tema e já em 1903 na primeira Convenção Sanitária Internacional das Repúblicas Americanas após sua criação institucionalizou a discussão sobre a transmissão vetorial da Febre Amarela, tema historicamente negligenciado e se orgulha de ter logrado a eliminação da Febre Amarela Urbana com a erradicação do *Aedes aegypti* em 1942⁶.

Fiel a sua missão de “promover a equidade na saúde, combater doenças, melhorar a

qualidade de vida e elevar a expectativa de vida dos povos das Américas”, a OPAS não mediu esforços para o apoio no enfrentamento desta epidemia, que contou com o auxílio da Rede Mundial de Alerta e Resposta a Surtos (GOARN).

A cooperação técnica da OPAS se concretizou de diversas formas: múltiplas capacitações, oficinas para troca de experiência e ações diretas nas áreas de vigilância epidemiológica, de epizootias, entomológica e laboratorial, manejo de pacientes, estruturação da rede de assistência e estratégias de vacinação. Também houve disseminação do conhecimento com apoio a construção de cursos EaD, edição de guias, contratação de pessoal para os laboratórios e atividades de epidemiologia de campo e aquisição de insumos estratégicos que foram desde gelo seco para garantir as pesquisas em entomologia e virologia, como de vacinas, até as licenças de software, insumos para diagnóstico molecular e histopatológico, entre muitos outros⁷. A OPAS também organizou a reunião da estratégia Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) da Organização Mundial da Saúde (OMS), UNICEF e Gavi – The Vaccine Alliance com mais de 130 parceiros pela primeira vez no continente americano. A cooperação técnica da OPAS apoiou a tomada de decisão do MS de adoção de dose única, recomendada pela organização desde 2013⁸ e o uso de dose fracionada em apoio a necessidade de vacinação de mais de 39.000.000 habitantes, as 7.648.772 doses fracionadas aplicadas proporcionaram uma economia de mais de 6.000.000 de doses. A figura 1 apresenta a linha do tempo com os principais marcos de cooperação no enfrentamento da Febre Amarela.

Significativos achados do vírus da febre amarela em macacos da família Callitrichidae, foram feitos por profissionais contratados pela OPAS cedidos aos Laboratórios Nacionais. Apoio aos gestores na tomada de decisão sobre a amplificação da área de recomendação de vacina, ajuste no esquema vacinal (adoção da dose única) e campanha com doses fracionadas também figuram entre as atividades de cooperações realizadas pela OPAS no Brasil durante a epidemia de febre amarela^{9,10}.

Cabe enfatizar a participação da OPAS na Vigilância Genômica do vírus da Febre Amarela (YFC), trabalho decisivo para direcionar as ações de resposta do Brasil e responder as inquietações nacionais e internacionais sobre a dinâmica de transmissão, incluindo o tipo de ciclo de transmissão (silvestre ou urbano), velocidade de deslocamento, origem do vírus, número de introduções do vírus nos estados (única ou reintrodução) etc.

Para este fim, se destaca o apoio da OPAS nos estudos que culminaram com as publicações “Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential” e “Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019”^{11,12}.

Este relato se faz necessário devido ao relativo enfraquecimento do papel da Organização Mundial de Saúde (OMS) na coordenação internacional dos esforços contra a COVID-19, diminuindo tanto o espírito solidário entre as Nações com o enfoque multilateral necessário para resposta, materializado pela retirada do financiamento da OMS por parte de nações poderosas¹³. Ainda com maior importância, temos o enfraquecimento da resposta a epidemia de Febre Amarela em curso no Brasil que continua mantendo significativa transmissão em PNH nas regiões Centro-Oeste e no Sul do Brasil em direção a tríplice fronteira Brasil – Paraguai – Argentina.

Referências

1. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Febre Amarela no monitoramento 2019/2020. Bol. Epidemiol 51, 12–28 (2020).
2. Organização Pan-americana da Saúde. Actualización Epidemiológica Fiebre amarilla 20 de marzo 2018. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50496/EpiUpdate20March2018_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Accessed July 30, 2020.
3. Instituto Evandro Chagas (IEC). Instituto Evandro Chagas detecta vírus da Febre Amarela em mosquito *Aedes albopictus* no Brasil [Internet]. IEC; 2018 [updated 2020 October 26; cited 2020 Nov 2]. Available from: <https://www.iec.gov.br/descoberta/>
4. Vasconcelos PFC. Febre amarela. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(2):275-93.
5. Organização Pan-americana da Saúde (OPAS). Brasil anuncia fracionamento de doses de vacina contra febre amarela em três estados [Internet]. OPAS; 2018. [updated 2020 October 24; cited 2020 Nov 2] Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5575:brasil-anuncia-fracionamento-de-doses-de-vacina-contra-febre-amarela-em-tres-estados&Itemid=820
6. Organização Pan-americana da Saúde (OPAS). OPAS/OMS colabora com

governo brasileiro e Espírito Santo na resposta ao surto de febre amarela [Internet]. OPAS; 2017 [updated 2020 October 27; cited 2020 Nov 2]. Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5389:opa-s-oms-colabora-com-governo-brasileiro-e-espírito-santo-na-resposta-ao-surto-de-febre-amarela-2&Itemid=812

7. Ministério da Saúde. Informe 27 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil-2017/2018. Available from: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>. Accessed July 30, 2020.

8. Faria N. R, Kraemer MUG, Hill SC, Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018;361:894–99.

9. Giovanetti M, Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. *J. Virol*. 2020;94:1623–42.

10. Conselho Nacional de Saúde (CNS), ACT Promoção da Saúde, Associação Brasileira de Enfermagem, Associação Brasileira de Ensino em Fisioterapia, Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, Associação Brasileira de Nutrição, et al. Carta aberta à sociedade brasileira, ao Congresso Nacional, ao CONASS e ao CONASEMS sobre a relevância da Organização Pan-Americana de Saúde para o SUS [Internet]. CNS; 2020. [updated 2020 July 27; cited 2020 Nov 2]. Available from: <http://www.conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/1268-o-brasil-precisa-da-opas-cns-adere-a-carta-em-defesa-da-organizacao-pan-americana-da-saude>.

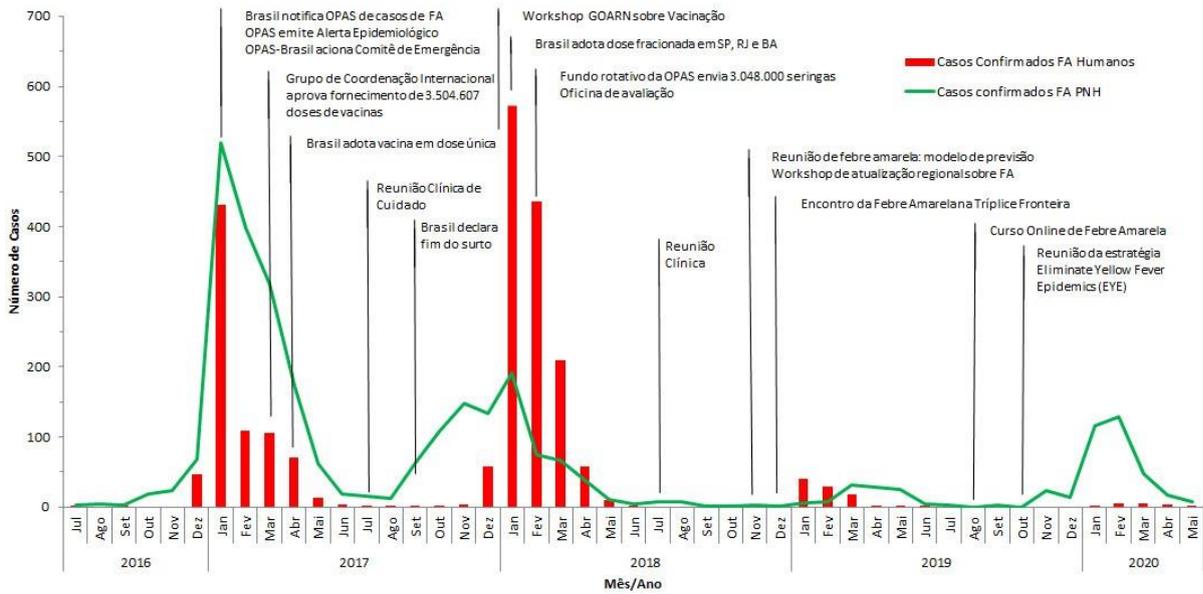


FIGURE 1: Caso confirmados de febre amarela em humanos e primatas não humanos por mês e linha do tempo da cooperação da OPAS na resposta a epidemia de febre amarela silvestre no Brasil de 2016 a 2019.

5.2 SEGUNDO Manuscrito (ANEXO 8)

Título: Monitoramento genômico e epidemiológico do potencial de transmissão do vírus da febre amarela

Autores: N. R. Faria, M. U. G. Kraemer, S. C. Hill, J. Goes de Jesus, R. S. Aguiar, F. C. M. Iani, J. Xavier, J. Quick, L. du Plessis, S. Dellicour, J. Thézé, D. O. Carvalho, G. Baele, C.H. Wu, P. P. Silveira, M. B. Arruda, M. A. Pereira, G. C. Pereira, J. Lourenço, U. Obolski, L. Abade, T. I. Vasylyeva, M. Giovanetti, D. Yi, D. J. Weiss, G. R. W. Wint, F. M. Shearer, S. Funk, B. Nikolay, V. Fonseca, T. E. R. Adelino, M. A. A. Oliveira, M. V. F. Silva, L. Sacchetto, P. O. Figueiredo, I. M. Rezende, E. M. Mello, R. F. C. Said, D. A. Santos, M. L. Ferraz, M. G. Brito, L. F. Santana, M. T. Menezes, R. M. Brindeiro, A. Tanuri, F. C. P. dos Santos, M. S. Cunha, J. S. Nogueira, I. M. Rocco, A. C. da Costa, S. C. V. Kominakis, V. Azevedo, A. O. Chieppe, E. S. M. Araujo, M. C. L. Mendonça, C. C. dos Santos, C. D. dos Santos, A. M. Mares-Guia, R. M. R. Nogueira, P. C. Sequeira, R. G. Abreu, M. H. O. Garcia, A. L. Abreu, O. Okumoto, E. G. Kroon, C. F. C. de Albuquerque, K. Lewandowski, S. T. Pullan, M. Carroll, T. de Oliveira, E. C. Sabino, R. P. Souza, M. A. Suchard, P. Lemey, G. S. Trindade, B. P. Drumond, A. M. B. Filippis, N. J. Loman, S. Cauchemez, L. C. J. Alcantara, O. G. Pybus

Resumo

A epidemia do vírus da febre amarela (VFA) no Brasil é a maior em décadas. A recente descoberta do vírus da febre amarela em mosquitos da espécie *Aedes albopictus* no Brasil destaca a necessidade de monitorar o risco de restabelecimento da transmissão urbana do vírus da febre amarela nas Américas. Nós usamos um conjunto de abordagens epidemiológicas, espaciais e genômicas para caracterizar a transmissão do vírus da febre amarela. Nós mostramos que a idade e distribuição do sexo em casos humanos é característica da transmissão silvestre. Análises dos casos de vírus de febre amarela com genomas gerados localmente revelam uma fase inicial da transmissão silvestre do vírus da febre amarela e uma expansão espacial em direção a áreas previamente livres do vírus da febre amarela, seguido por um aumento no transbordamento viral para humanos no final de 2016. Esses resultados estabelecem um esquema para o monitoramento da transmissão do VFA em tempo real que vai contribuir para a estratégia global de eliminar futuras epidemias do VFA.

A febre amarela (FA) é responsável por 29.000 a 60.000 mortes anualmente na América do Sul e África (1) e é a infecção mais severa transmitida por mosquitos nos trópicos (2). Apesar da existência de uma vacina efetiva contra febre amarela desde 1937 (3), um estimado >400 milhões de pessoas não vacinadas vivem em áreas com risco de infecção (4). O vírus da febre amarela (VFA) é um membro da família Flaviridae e é classificado em quatro genótipos: africano do leste, africano do oeste, sul-americano I e sul-americano II (5-9). Nas Américas, a transmissão do VFA ocorre

principalmente por meio do ciclo silvestre em que primatas não-humanos (PNHs) são infectados por mosquitos vetores que habitam em árvores, como os *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. (10, 11). A transmissão do VFA também pode ocorrer por meio de um ciclo urbano em que humanos são infectados por mosquitos *Aedes* spp. que se alimentam principalmente de humanos (12, 13).

O Brasil tem passado recentemente pelo seu maior surto de FA registrado em décadas, com 2043 casos confirmados e 676 mortes desde dezembro de 2016 (Texto Suplementar e fig. S1) (14). Os últimos casos de FA no Brasil atribuídos a um ciclo urbano foram na Sena Madureira, no norte do estado do Acre em 1942 (15). Uma intensa campanha de erradicação eliminou o *Aedes aegypti* e a FA do Brasil na década de 1950 (16), mas o vetor se restabeleceu na década de 1970 e os mosquitos *Aedes* spp. são agora abundantes ao longo da maior parte do Brasil (17). As consequências de uma reiniciação do ciclo urbano da transmissão no Brasil seriam sérias, sendo que um número estimado de 35 milhões de pessoas em áreas de risco para a transmissão do VFA no Brasil continuam não vacinadas (4). Novas abordagens de vigilância e analíticas são portanto necessárias para monitorar esse risco em tempo real.

Surto do vírus de febre amarela no Brasil (2016-2017)

Entre dezembro de 2016 e o final de junho de 2017, haviam 777 casos confirmados de febre amarela em humanos detectados por reação em cadeia da polimerase (PCR) ao longo de 10 estados brasileiros - a maior parte em Minas Gerais (MG) (60% dos casos), seguido pelo Espírito Santo (32%), Rio de Janeiro (3%) e São Paulo (3%) (18). A razão de fatalidade de casos severos de FA foi estimada em 33.6%, comparável a surtos anteriores (19, 20). Apesar da magnitude excepcional e rápida expansão do surto, pouco se sabe sobre a sua epidemiologia genômica. Além disso, é incerto como o vírus está se espalhando pelo espaço, assim como entre humanos e PNHs, existindo uma falta de reflexões analíticas sobre a contribuição do ciclo urbano para a transmissão em curso.

Para a caracterização do surto do VFA em 2017 no Brasil, nós primeiro comparamos a série temporal confirmada de casos em humanos (n=683) e PNHs (n=313) reportada até outubro de 2017 pelos institutos públicos de saúde em MG, o epicentro do surto (Fig. 1 (A e B) e fig. S2). As séries temporais estão fortemente

associadas (coeficiente de correlação cruzada= 0.97; $P < 0.001$). Ambas atingiram o pico no final de janeiro de 2017 e nós estimamos que casos humanos estariam atrás destes em PNHs por 4 dias (tabela S1). Casos em PNH são geograficamente mais dispersos em MG do que casos humanos, que são mais concentrados nos municípios de Teófilo Otoni e Manhuaçu (Fig. 1, D e E). Apesar disso, os números de casos humanos e PNHs por município estão positivamente correlacionados (Fig. 1F).

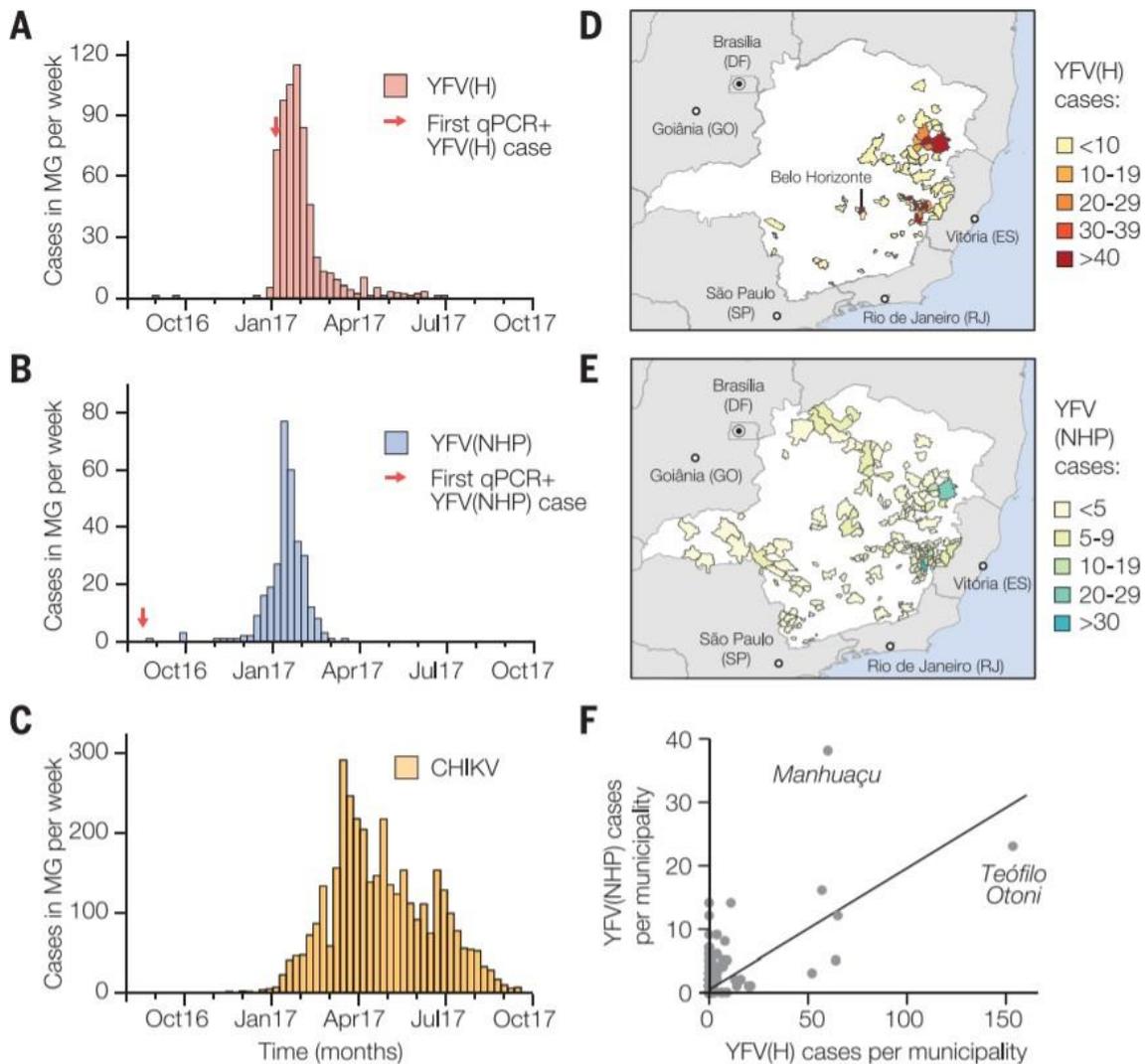


Fig. 1. Epidemiologia espacial e temporal do VFA e VCHIK em Minas Gerais (MG). (A) Série temporal de casos humanos do VFA em MG (676 casos em 61 municípios) - confirmados por sorologia, PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-qPCR) ou isolamento do vírus - durante a primeira onda da epidemia do VFA (agosto de 2016 a outubro de 2017). (B) O mesmo que em (A), mas mostrando casos do VFA em PNH (313 casos em 90 municípios) confirmados por RT-qPCR. (C) O mesmo que em (A), mas mostrando casos humanos de VCHIK (3668 casos em 129 municípios). (D) Distribuição geográfica de casos humanos do VFA em MG. (E) Distribuição geográfica de casos do VFA em PNH em MG. Figura S3 mostra a distribuição geográfica correspondente dos casos do VCHIK. (F) Associação entre o número de casos humanos e PNH em cada município de MG (Pearson's $r=0.62$; $P<0.0001$; índice não paramétrico de Spearman $r = 0.32$; $P < 0.05$).

Para estabelecer se os casos humanos são contraídos em proximidade a fontes potenciais de infecções silvestres, nós estimamos a distância entre o município de residência de cada caso humano e a transmissão potencial mais próxima determinada usando o índice de vegetação aprimorado (IVA) (21) (Materiais Suplementares). A distância média mínima entre áreas com IVA > 0.4 e a residência de casos humanos confirmados é de apenas 5.3 km. Em contraste, um residente de MG escolhido aleatoriamente vive, em média, ≥ 51 km distante de áreas com EVI > 0.4. Similarmente, casos humanos do VFA residem, em média, a 1.7 km do caso em PNH mais próximo, enquanto a distância média mínima de um residente aleatoriamente escolhido em MG até o caso NPH mais próximo é de 39.1 km. Isso é consistente com o risco de infecção por FA ser maior em pessoas que residem ou trabalham em áreas florestais onde ocorre transmissão silvestre. Nós encontramos que a maior parte dos casos humanos (98.5%) foram reportados em municípios com uma cobertura de vacinação para o VFA maior do que um limiar de 80% recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em média, casos humanos teriam que viajar 65 km desde o seu local de residência até chegar em uma área em que a cobertura de vacinação seja <80% (4).

Risco de transmissão urbana do VFA

O VFA foi detectado em mosquitos *Aedes albopictus* capturados em MG em janeiro de 2017 (22). Além disso, experimentos sugerem que mosquitos do sudeste do Brasil podem transmitir o VFA brasileiro, apesar de talvez menos efetivamente que vetores de outros lugares do país (23, 24). É, portanto, importante investigar se casos do VFA em MG ocorrem onde e quando os vetores *Aedes* spp. estão ativos. Para fazer isso, nós analisamos casos confirmados do vírus chikungunya (VCHIK) de MG (Fig. 1C).

VCHIK é transmitido pelos mosquitos urbanos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (25). Houveram 3755 casos confirmados de VCHIK em MG durante janeiro de 2015 a outubro de 2017. A epidemia de VCHIK em MG em 2017 começou depois e durou mais do que o surto do VFA (Fig. 1C), consistente com a hipótese de que o VFA e VCHIK na região são transmitidos por diferentes espécies vetores. Entretanto, 29 municípios com casos do VFA humano também reportaram casos de VCHIK (Fig. 1D e fig. S3), indicando que o VFA está realmente presente em municípios com mosquitos *Aedes*. A média das taxas de vacinação em distritos com casos de ambos (VFA e

VCHIK) é de 72.6% (variação=61 a 78%) (4). Portanto, taxas relativamente altas de vacinação em locais de MG onde o transbordamento de FA ocorre para humanos e a potencialmente baixa competência do vetor (23, 24) podem amenizar o risco do estabelecimento de um ciclo urbano do VFA no estado. Entretanto, regiões urbanas adjacentes (incluindo São Paulo e Rio de Janeiro) tem menores taxas de vacinação (4), recebem dezenas de milhões de visitantes por ano (26) e tem experimentado recentemente muitos casos humanos do VFA (20). Portanto, a possibilidade da transmissão sustentada urbana do VFA no sul do Brasil e além, necessita de um monitoramento virológico e epidemiológico contínuo.

Procuramos estabelecer um esquema para avaliar as rotas de transmissão do VFA durante um surto das características dos indivíduos infectados. Especificamente, nós avaliamos se um surto é ocasionado por transmissões silvestres ou urbanas por meio da comparação da distribuição da idade e sexo dos casos observados do VFA com aqueles esperados sob um ciclo urbano em MG. Por exemplo, o risco de um indivíduo em adquirir o VFA por meio de um ciclo silvestre depende das chances de ele viajar para áreas com florestas, um evento que é tipicamente maior entre homens adultos (27). Em contraste, sob um ciclo urbano, nós esperamos uma exposição mais uniforme dentre classes de diferentes idades e sexos, similar ao observado para casos urbanos no Paraguai (28) e Nigéria (29).

A razão de sexo relatada para casos com VFA em MG é de 5.7 (85% dos casos são homens) e a incidência é maior entre homens com idades entre 40 e 49 anos (Fig. 2). Nós comparamos essa distribuição com aquela esperada sob dois modelos de transmissão urbana (materiais suplementares). No modelo M1, as classes de idade e sexo variam no status de vacinação, mas são igualmente expostas ao VFA, um cenário que é típico para a transmissão arboviral (30). Sob o modelo M1, os casos previstos são caracterizados por uma razão sexual ~ 1 e picos de incidência entre indivíduos com idades entre 20 e 25 anos (Fig. 2). No modelo M2, nós assumimos que o padrão de exposição do VFA entre classes de idade e sexo segue o observado para o VCHIK. A razão sexual reportada para casos do VCHIK em MG é de 0.49 (33% dos casos são homens) (fig. S4). Sob o modelo M2, a incidência prevista é maior em fêmeas com idades > 30 anos. A discrepância entre a distribuição observada e aquela prevista sob os dois modelos de ciclos urbanos indicam que a epidemia de FA em MG é dominada pela transmissão silvestre. Esse método mostra que dados

epidemiológicos estruturados pela idade e sexo podem ser usados para avaliar qualitativamente o modo de transmissão do VFA durante um surto.

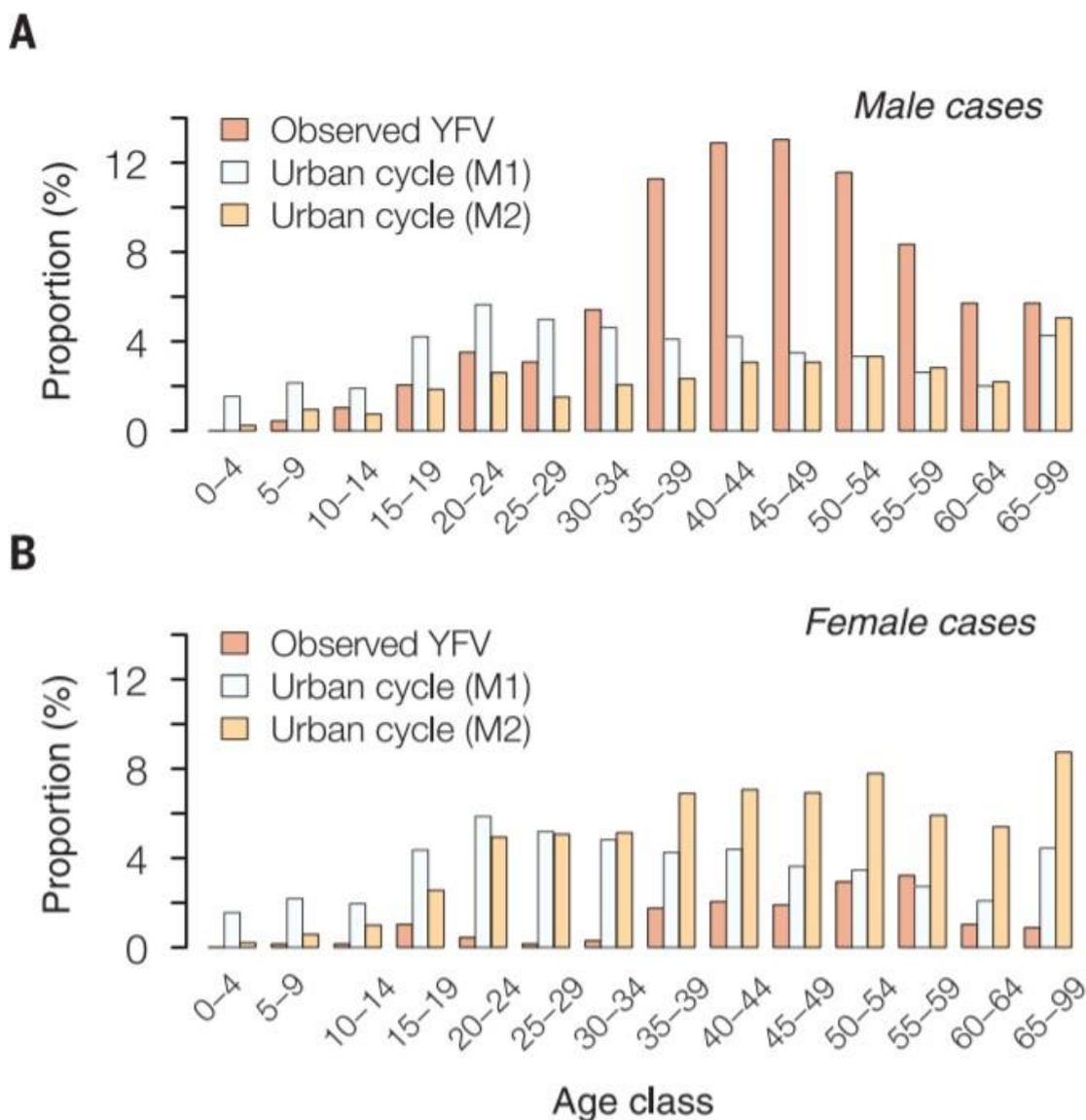


Fig. 2. Distribuição do sexo e idade dos casos do VFA em MG (2016–2017). Barras vermelhas mostram a proporção dos casos observados de VFA em MG que ocorrem em cada classe etária. (A) homens e (B) mulheres. Essas distribuições empíricas são diferentes daquelas previstas sob dois modelos (M1, barra azul clara; M2, barra laranja) do ciclo urbano de transmissão (ver o texto para detalhes).

Vigilância genômica do surto brasileiro do VFA

Durante um surto de FA, é importante realizar a vigilância virológica para (i) rastrear as origens da epidemia e os pontos de maior transmissão, (ii) caracterizar a diversidade genética para auxiliar no diagnóstico molecular, (iii) detectar mutações virais associadas com a severidade da doença e (iv) excluir a possibilidade de que casos humanos são causados pela reversão da vacina. Nós geramos 62 genomas

completos de FA de humanos infectados (n=33) e PNHs (n=29) originários dos estados brasileiros mais afetados, incluindo MG (n=51), Espírito Santo (n=8), Rio de Janeiro (n=2) e Bahia (n=1) (Fig. 3 e tabela S3). Nós também relatamos dois genomas de amostras coletadas em 2003 durante um surto prévio em MG de 2002 a 2003. (31). Genomas foram gerados no Brasil usando uma combinação de métodos (tabelas S5 até S7); metade foram gerados em MG usando um protocolo sequenciador de VFA para MinION portátil adaptado de (32) (tabelas S4 e S5). Esse protocolo foi disponibilizado publicamente em maio de 2017 depois da finalização do piloto de experimentos de sequenciação usando uma cepa da vacina cultivada (materiais suplementares). A mediana de cobertura do genoma foi similar para amostras obtidas de PNHs [99%; valor limiar da mediana do ciclo (Ct) = 11] e de casos humanos (99%; mediana Ct= 16) (tabelas S5 até S7).

Para colocar os novos genomas sequenciados de VFA num contexto global, nós adicionamos nossos genomas a um conjunto de 61 genomas publicamente disponíveis (33, 34). Nós desenvolvemos e aplicamos uma ferramenta automatizada filogenética online para identificar e classificar as sequências de genes do VFA (também publicamente disponíveis, checar materiais suplementares). Filogenias estimadas por essa ferramenta junto com maximum likelihood (probabilidade máxima) e métodos Bayesianos, consistentemente puseram as cepas dos surtos brasileiros em um único clado junto com o genótipo América do Sul I (AS I) com suporte estatístico máximo (bootstrap= 100%; probabilidade posterior>0.99) (Fig. 3A e fig. S5).

O grupo externo ao clado do surto é a cepa Ba655417, um caso humano amostrado em Alto Alegre, Roraima, norte do Brasil, em 2002. Em contraste, amostras feitas durante o surto anterior em MG em 2003 são mais distantemente relacionadas ao clado do surto dentro do genótipo SA1 (Fig. 3A). Portanto, o surto de 2017 foi mais provavelmente causado pela cepa do VFA introduzido de uma área endêmica, possivelmente do norte ou centro-oeste do Brasil (35) do que pela reemergência de uma linhagem que tenha persistido em MG. Apesar das baixas densidades de amostragem significarem que essa conclusão é provisória, cenários similares foram sugeridos para epizootias brasileiras anteriores (36). O hiato de 14 anos entre o surto atual e a data da cepa de um não surto mais proximamente relacionado concorda com a periodicidade reportada para surtos de FA no norte do Brasil (37), que se achava que era direcionada pela abundância do vetor e acumulação dos hospedeiros PNHs suscetíveis (19, 38).

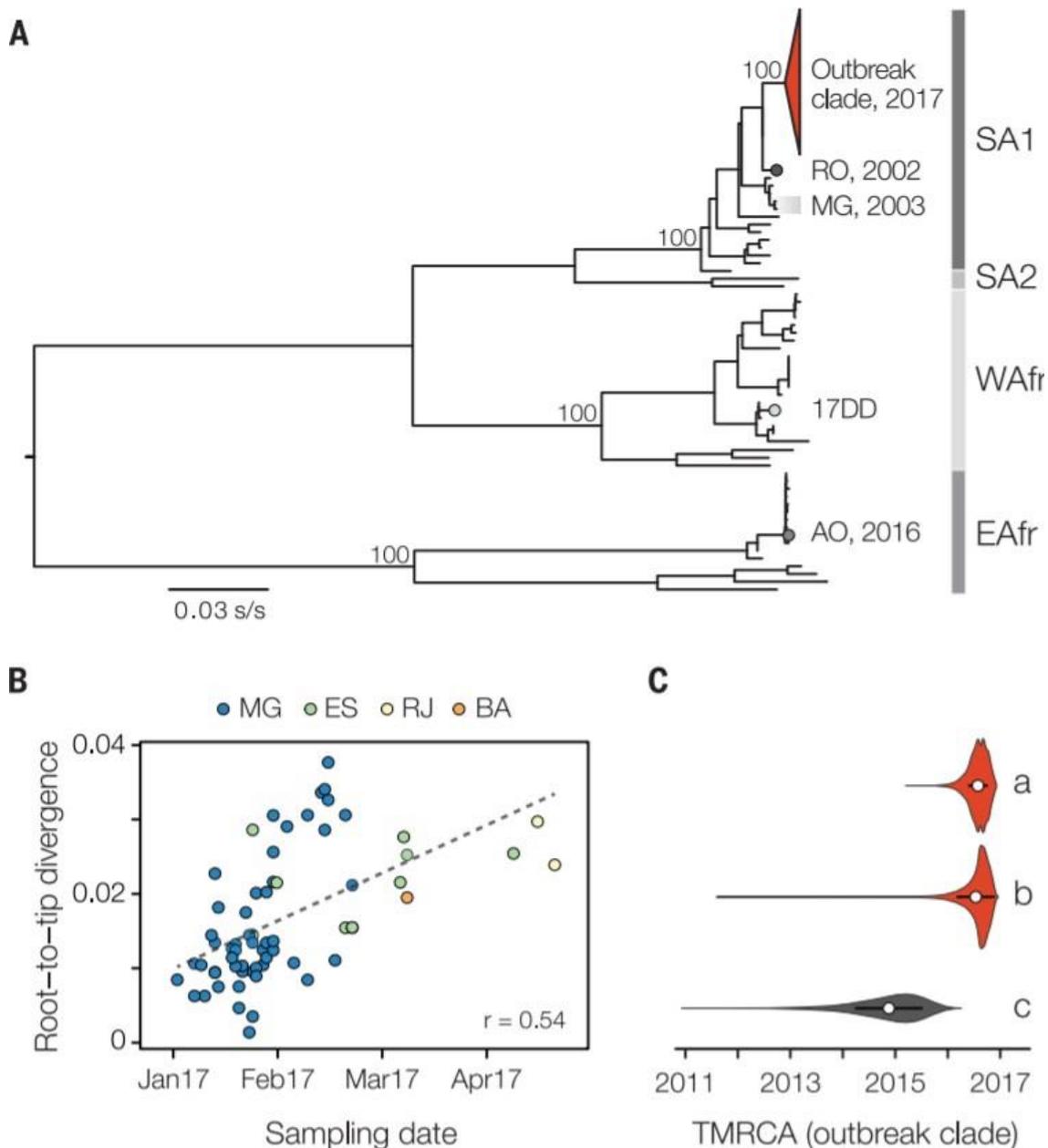


Fig. 3. Filogenia molecular da epidemia brasileira do VFA. (A) Filogenia maximum likelihood (com probabilidade máxima) dos genomas completos de VFA mostrando o clado do surto (triângulo vermelho) dentro do genótipo da América do Sul I (SA1) (Fig. 4 e fig. S6). A2, WAfr e EAfr indicam genótipos da América do Sul II, Oeste Africano e Leste Africano, respectivamente. Para deixar mais claro, cinco cepas de VFA introduzidas na Venezuela do Brasil (49) não são mostradas. A escala da barra está em unidades de substituição por sítio (s/s). Os rótulos dos nós indicam valores de suporte bootstrap. RO 2002, cepa BeH655417 de Roraima; MG 2003, duas cepas de surtos prévios de FA em MG em 2003; 17DD, a cepa da vacina usada no Brasil; AO 2016, surto de VFA Angola em 2015-2016 (13). (B) Regressão raiz-a-ponta da data de amostragem da sequência com a divergência genética da raiz do clado do surto (fig. S6). As sequências estão coloridas de acordo com o local de amostragem (MG, Minas Gerais; ES, Espírito Santo; RJ, Rio de Janeiro; BA, Bahia). (C) Gráficos em violino mostrando as distribuições posteriores estimadas (círculos brancos indicam médias) do tempo do ancestral comum mais recente (TACMR) do clado do surto. Estimativas foram obtidas usando dois datasets diferentes (cinza, genótipo SA1; vermelho, clado do surto) e sob diferentes modelos evolutivos: a, modelo de regressão logística (MRLRNC) com uma árvore de skygrid anterior com covariáveis, os dados de séries temporais mostrados nas Fig. 1, A a C; veja também a fig. S7); b, modelo UCLN com árvore skygrid anterior sem covariáveis; c, modelo de relógio local fixado (ver materiais suplementares).

Pelo menos sete humanos de MG com confirmação para o VFA por meio de PCR receberam a vacina de FA antes do aparecimento dos sintomas. Para testar se essas ocorrências foram causadas por infecções naturais e não por reativações da vacina, nós sequenciamos os genomas do VFA de três desses casos (Fig. 3A e tabela S3). Nossa análise filogenética claramente mostra que esses representam infecções naturais causadas pelo surto em andamento e conclusivamente não são derivadas das cepas da vacina 17DD (que pertence ao genótipo do VFA africano do oeste) (Fig 3A e fig. S6).

Unificando a epidemiologia do VFA e a evolução molecular

Genomas de vírus são fontes valiosas de informação sobre a dinâmica de epidemias (39), mas são raramente usados para investigar surtos específicos do VFA em detalhes. Nós mostramos aqui como uma variedade de três abordagens analíticas, que combinam genética, epidemiologia e dados espaciais, podem prover insights na transmissão do VFA.

Primeiro, nós usamos um método Bayesiano (40) para explorar flutuações de potenciais covariáveis no tamanho efetivo da população do surto do VFA em 2017. Depois de encontrar que a divergência genética no clado do surto se acumula ao longo da escala temporal de amostragem (Fig. 3B e fig. S6), apesar de fracamente, nós procuramos determinar qual a série temporal epidemiológica melhor descreve os padrões no tamanho efetivo da população inferido de VFA. Nós encontramos que flutuações no tamanho efetivo populacional do surto do VFA são bem explicadas pelas dinâmicas de casos de ambos, humanos e PNHs (probabilidade de inclusão: 0.37 para casos humanos e 0.63 para casos em PNH) (tabela S8). Essas duas séries temporais do VFA explicam as dinâmicas da diversidade genética do surto em andamento 103 vezes mais efetivamente do que a incidência do VCHIK (probabilidade de inclusão <0.001), que representa a transmissão por vetores *Aedes* spp. Um benefício dessa abordagem é que os dados epidemiológicos contribuem para a estimação da escala temporal do surto. Por meio da incorporação de dados da incidência do VFA na inferência evolutiva, nós estimamos o tempo do ancestral comum mais recente (TACMR) do clado do surto ser em julho de 2016 [95% Intervalo Bayesiano de Credibilidade (IBC): março a novembro de 2016] (Fig. 3C e fig. S7), consistente com a data do primeiro caso confirmado por PCR do VFA em um PNH em MG (julho de

2016). A incerteza ao redor da estimativa do TACMR é reduzida em 30% quando os dados genômicos e epidemiológicos são combinados em comparação com o uso apenas de dados genéticos (Fig. 3C).

Segundo, para entender a transmissão do VFA entre humanos e PNHs, nós medimos o movimento das linhagens do VFA entre reservatórios de PNHs e humanos, usando um modelo coalescente filogeneticamente estruturado (41). Apesar de estudos prévios terem confirmado que o VFA está circulando em cinco famílias de PNH neotropicais (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Pitheciidae e Cebidae) (Fig. 4A), até agora genomas de FA em PNHs durante o surto de 2017 foram registrados apenas em *Alouatta* spp. (família Cebidae) (33). Nessa análise, nós usamos estimativas TACMR obtidas acima (Fig 3C) para informar a escala de tempo filogenético (Fig. 4B). Todos os nós internos da filogenia do surto nos quais o estado do hospedeiro foram bem apoiados (probabilidade posterior >0.8), foram inferidos que pertencem a população de PNH, consistente com a ausência da transmissão urbana e em concordância com um grande número de casos em PNH reportados no sudeste do Brasil (20). Apesar disso, nós advertimos que as hipóteses de ligação de transmissão entre seres humanos não devem ser testadas diretamente usando apenas dados filogenéticos devido a uma larga subamostragem das infecções em PNHs. Notavelmente, a abordagem estruturada coalescente revela mudanças substanciais na frequência de transições entre hospedeiros humanos-PNHs ao longo do tempo, aumentando de zero próximo a novembro de 2016 e atingindo um pico em fevereiro de 2017 (Fig. 4C). Esse padrão filogenético corresponde a série temporal de casos confirmados do VFA em MG (Fig. 1 (A e B), demonstrando que os genomas virais, quando analisados usando modelos apropriados, podem ser usados para rastrear quantitativamente as dinâmicas de zoonoses durante o curso do surto (42).

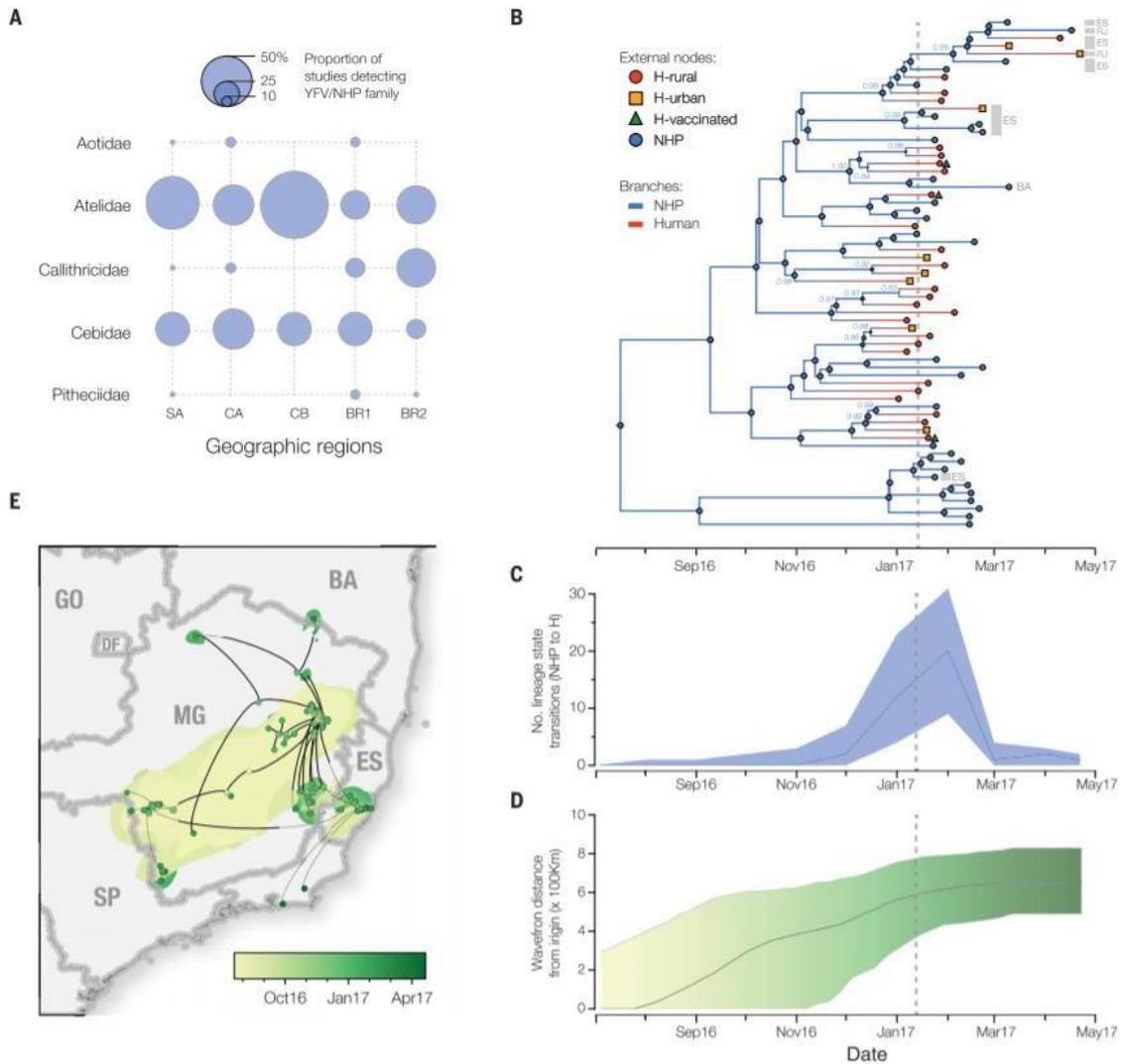


Fig. 4. Dinâmicas espaciais e evolutivas do surto do VFA. (A) A detecção da frequência de VFA em PNHs nas Américas (50). Tamanho do círculo representa a proporção de estudos publicados ($n=15$) que detectaram o VFA em cada família de primata e região. SA, América do Sul (exceto Brasil); CA, América Central; CB, Caribe; BR1, Brasil (antes de 2017); BR2, Brasil (esse estudo). (B) Filogenia de máxima de credibilidade de clado inferida sob um modelo coalescente estruturado sob dois estados (humanos e PNHs). Símbolos de nós externos significam o tipo de amostra. Barras cinza e etiquetas representam a localização da amostra (RJ, Rio de Janeiro; ES, Espírito Santo; BA, Bahia; outros foram amostrados em MG). Nós internos cujas probabilidades de estado posterior são $> 0,8$ são marcados por círculos. Os rótulos dos nós indicam probabilidades de estado posterior para os nós selecionados. As ramificações internas são azuis para os PNHs e vermelhas para os seres humanos. A Figura S8 mostra uma árvore totalmente anotada. (C) Número médio de transições de estado filogenético do VFA (de NHPs para humanos) por mês. Linha sólida, estimativa mediana; área sombreada, 95% BCI. (D) Expansão da frente de onda epidêmica do VFA estimada usando uma abordagem filogeográfica contínua (35). Em cada momento, o gráfico mostra a distância espacial máxima entre os ramos da filogenia e a localização inferida da origem do surto. Linha sólida, estimativa mediana; área sombreada, 95% BCI. As linhas tracejadas em (B) e (D) indicam quando a FA foi declarada uma emergência de saúde pública em MG (13 de janeiro de 2017). (E) Difusão espaço-temporal reconstruída do surto de VFA. Os ramos da filogenia estão dispostos no espaço de acordo com a localização dos nós da filogenia (círculos). As localizações dos nós externos são conhecidas, enquanto as dos nós internos são inferidas (44). DF, Distrito Federal; GO, Goiás; SP, São Paulo. As regiões sombreadas representam 95% das regiões credíveis dos nós internos. Nós e regiões de incerteza foram coloridas de acordo com o tempo.

Terceiro, nós usamos uma abordagem filogenética de random walk (caminho aleatório) para medir a dispersão espacial do surto (43) (materiais suplementares, métodos e tabela S9). Quando projetado ao longo do espaço e do tempo (Fig. 4 (D e E) e filme S1), a filogenia mostra uma disseminação de linhagens do vírus no sul a partir de sua origem inferida em MG em direção a áreas densamente povoadas, incluindo o Rio de Janeiro e São Paulo (onde a vacinação de FA não foi recomendada até julho de 2017 e janeiro de 2018, respectivamente). Nós estimamos que as linhagens se movem, em média, 4,25 km/dia (95% IBC: 2,64 a 10,76 km/dia) (44). Essa velocidade é similar quando ramos terminais do VFA são removidos (5.3 km/dia) e, portanto, mais provavelmente reflete movimentos da linhagem do VFA dentro de um ciclo silvestre e não o movimento de humanos assintomáticos infectados. Essas taxas são maiores do que as esperadas com base nas distâncias que o vírus tipicamente viaja por meio de PNHs na região (45) e sugere a possibilidade de que o movimento de linhagens do VFA podem ter sido auxiliados pela atividade humana - isto é, pelo transporte de mosquitos infectados em veículos (46) , caça ou comércio ilegal de PNHs na Floresta Atlântica (47, 48). A frente da onda epidêmica (distância máxima dos ramos filogenéticos da origem inferida da epidemia) expandiu constantemente entre agosto de 2016 e fevereiro de 2017 com uma taxa estimada de ~3.3 km/dia. Portanto, no momento em que a FA foi declarada uma emergência de saúde pública em MG (13 de janeiro de 2017; linhas tracejadas na Fig. 4 (B a D), a epidemia já tinha se expandido ~600 km (Fig. 4D) e causado >100 casos reportados em ambos, humanos e PNHs (Fig. 1). Notavelmente, a primeira detecção em humanos em dezembro de 2016 foi concomitante com a fase de expansão espacial do surto (Fig. 4D) e ao aumento na estimativa de zoonoses entre PNH-humanos (Fig. 4C); ambas foram provavelmente impulsionadas por um aumento na abundância de vetores silvestres. Portanto, a linhagem do surto parece ter circulado entre PNHs em uma em uma área geográfica cada vez maior por diversos meses antes dos casos humanos terem sido detectados.

Conclusão

A vigilância epidemiológica e genômica humanas e em populações de animais em risco são cruciais para a detecção e rápida contenção da transmissão do VFA. A epidemia do VFA no Brasil continua a se desenvolver com um aumento nos casos

desde dezembro de 2017. Estudos longitudinais de PNHs são necessários para entender como linhagens do VFA se disseminam ao longo da América do Sul entre surtos e como a epizootia é determinada pela dinâmica dos animais suscetíveis no reservatório. Para atingir as metas da OMS de eliminar epidemias de FA até 2026, a vigilância de FA necessita uma estratégia global coordenada. Nossos resultados e análises mostram que a vigilância genômica rápida do VFA, quando integrado com dados epidemiológicos e espaciais, pode ajudar a antecipar o risco humano de exposição ao VFA durante o tempo e espaço e monitorar as chances de transmissões silvestres e urbanas. Nós esperamos que o kit de ferramentas introduzido aqui seja útil em guiar o controle da FA de uma maneira que seja eficiente em termos do uso de recursos.

5.3 Manuscrito:

Título: Reemergência e propagação do vírus da febre amarela no sudeste do Brasil, 2016–2019

Autores: Marta Giovanetti, Marcos Cesar Lima de Mendonça, Vagner Fonseca, Maria Angélica Mares-Guia, Allison Fabri, Joilson Xavier, Jaqueline Goes de Jesus, Tiago Gräf, Cintia Damasceno dos Santos Rodrigues, Carolina Cardoso dos Santos, Simone Alves Sampaio, Flavia Lowen Levy Chalhoub, Fernanda de Bruycker Nogueira, Julien Theze, Alessandro Pecego Martins Romano, Daniel Garkauskas Ramos, Andre Luiz de Abreu, Wanderson Kleber Oliveira, Rodrigo Fabiano do Carmo Said, Carlos F. Campelo de Albuquerque, Tulio de Oliveira, Carlos Augusto Fernandes, Shirlei Ferreira Aguiar, Alexandre Chieppe, Patrícia Carvalho Sequeira, Nuno Rodrigues Faria, Rivaldo Venâncio Cunha, Luiz Carlos Junior Alcantara, Ana Maria Bispo de Filippis

RESUMO

O recente reemergência do vírus da febre amarela (VFA) no Brasil levantou sérias preocupações devido à rápida disseminação do vírus na região sudeste. Para entender melhor a diversidade genética e a dinâmica genética do VFA durante o recente surto no sudeste do Brasil, geramos 18 genomas completos e quase completos a partir do pico da curva epidêmica de primatas não-humanos (NHPs) e casos de infecção humana nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. O sequenciamento genômico de 18 genomas de VFA revelou o tempo, a origem e as rotas prováveis de transmissão e dispersão do vírus da febre amarela durante um dos maiores surtos já registrados no Brasil. Nós mostramos que, durante a recente epidemia, o VFA foi reintroduzido de Minas Gerais para os estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro múltiplas vezes entre os anos de 2016 e 2019. A análise dos dados do sequenciamento portátil pode identificar o corredor de dispersão do VFA. Esses achados reforçam a ideia de que estratégias contínuas de vigilância genômica podem fornecer informações sobre a diversidade genética e a dinâmica de transmissão de vírus que podem auxiliar na compreensão de epidemias de arboviroses.

Importância

As infecções por arbovírus no Brasil, incluindo febre amarela, dengue, zika e chikungunya, resultam em considerável morbidade e mortalidade e estão aumentando as preocupações sobre saúde pública. No entanto, nossa compreensão desses surtos

é dificultada pela disponibilidade limitada de dados genômicos. Neste estudo, investigamos a diversidade genética e a distribuição espacial do VFA durante o surto atual, analisando dados genômicos de áreas do sudeste do Brasil não cobertas por outros estudos anteriores. Para obter informações sobre as rotas de introdução e dispersão do VFA, nós rastreamos o vírus por meio do sequenciando genomas do VFA amostrados de primatas não-humanos e pacientes infectados da região sudeste. Nosso estudo fornece uma compreensão de como o VFA inicia a transmissão em novas regiões brasileiras e ilustra que a genômica aplicada em estudos de campo pode melhorar as abordagens tradicionais para a vigilância e controle de doenças infecciosas.

Palavras-chave: febre amarela, surto, sudeste do Brasil, vigilância genômica, resposta a surtos.

A febre amarela (FA) é uma doença transmitida por vetores e endêmica a áreas tropicais da África e da América do Sul (1). O agente etiológico é o vírus da febre amarela (VFA), um vírus de RNA de cadeia simples sentido positivo, pertencente à família Flaviviridae (2). A diversidade do VFA pode ser classificada em quatro genótipos distintos, que foram nomeados com base em sua distribuição geográfica: genótipos da África Oriental, África Ocidental, América do Sul I e América do Sul II (3–6).

Nas Américas, a transmissão do VFA pode ocorrer através de dois ciclos principais de transmissão epidemiológica, os ciclos silvestres (ou na selva) e urbano (doméstico). No ciclo silvestre, os primatas não-humanos (PNHs) são infectados pela picada de mosquitos vetores, tais como *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. (7, 8) No entanto, no ciclo urbano, os seres humanos podem ser infectados por picadas de mosquitos de *Aedes* sp. (9). A infecção pelo VFA em humanos mostra um amplo espectro de severidade da doença, incluindo infecção assintomática; doença leve com sintomas semelhantes à dengue, incluindo febre, náusea, vômito e fadiga; e doença, incluindo febre com icterícia ou hemorragia e morte (10).

Enquanto a erradicação não é possível devido ao sistema de reservatórios da vida selvagem, a cobertura vacinal em larga escala fornece proteção considerável contra a reurbanização da transmissão do VFA (11). No entanto, apesar da disponibilidade de vacinas efetivas, a FA continua sendo um importante problema de saúde pública

na África e na América do Sul. No final de 2016, ocorreu uma severa reemergência da epidemia do VFA no sudeste do Brasil. A epidemia evoluiu para se tornar a maior observada no país em décadas, atingindo áreas próximas à Mata Atlântica (11, 12). A epidemia do VFA de 2016 a 2017 no Brasil foi responsável por 1.412 epizootias, 777 casos confirmados em humanos de FA, a maioria dos quais ocorreu no sudeste do Brasil (Minas Gerais, n=465; São Paulo, n=22; Rio de Janeiro=25; Espírito Santo, n=252 casos confirmados) e 261 mortes humanas (13). Após essa epidemia, novos casos foram relatados entre 2017 e 2018, sendo que nesse período foram registradas 864 epizootias, 1.376 casos confirmados de FA em humanos e 483 mortes humanas registradas, com os estados do sul entre os mais afetados pela epidemia do VFA (Minas Gerais, n=532; São Paulo, n=377; Rio de Janeiro, n=186; Espírito Santo, n=6 casos confirmados) (14). A epidemia persistiu em 2018 e 2019 e representou 1.883 casos notificados em PNHs (n=20 casos confirmados pelo PNHs) e 12 casos humanos confirmados, incluindo 5 mortes humanas no estado de São Paulo. A maioria dos casos epizoóticos confirmados foi registrada nos estados do sudeste (95%) (São Paulo, n=10; Rio de Janeiro, n=8; e Minas Gerais, n=1) (13-15).

Embora atualmente não exista evidência que a transmissão urbana tenha ocorrido, o surto afetou áreas altamente infestadas por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, onde a vacinação contra a febre amarela foi recentemente introduzida em um programa de imunização de rotina. Isso suscita a preocupação de que pela primeira vez em décadas, possa haver um alto risco de transmissão urbana de VFA no Brasil (16). Novas abordagens analíticas e de vigilância são, portanto, necessárias para monitorar esta ameaça.

Mesmo assim, existem informações limitadas de estudos de vigilância genômica sobre a epidemiologia genômica e as dinâmicas de disseminação do VFA em circulação no sudeste do Brasil entre 2016 a 2019. Estudos anteriores mostraram a dinâmica espacial e evolutiva do atual surto do VFA em diferentes estados do sudeste (11) e lançaram luz sobre a possível cocirculação de diferentes linhagens de VFA (17). No entanto, ainda há informações limitadas sobre a epidemiologia genômica do VFA circulando nos estados do Espírito Santo e no Rio de Janeiro a partir de estudos de vigilância genômica e isso prejudica nossa compreensão da reintrodução, estabelecimento e disseminação do vírus nessas regiões. Portanto, para entender melhor a reemergência da epidemia recente do VFA nessas regiões, nós analisamos

um conjunto de dados maior e atualizado dos dados divulgados recentemente da epidemia do VFA no Brasil entre 2016 a 2019, incluindo 18 genomas completos recém-gerados de áreas não cobertas por outros estudos anteriores de humanos e PNHS dos estados do sudeste de Espírito Santo e Rio de Janeiro (este artigo foi submetido a um arquivo de pré-impressão on-line [18].)

RESULTADOS

Diagnóstico molecular e sequenciamento de genoma de amostras clínicas.

Amostras de fígado, baço, rim e sangue de 14 PNHS e amostras de fígado e soro de 4 casos humanos infectados coletados em áreas não cobertas por outros estudos anteriores nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, sudeste do Brasil, entre janeiro de 2017 e abril 2018, foram testados para o RNA do VFA usando o ensaio quantitativo de PCR para transcrição reversa (RT-qPCR) (19, 20) no Laboratório de Flavivírus da FIOCRUZ Rio de Janeiro (LABFLA / FIOCRUZ).

A maioria dos casos confirmados em PNHS foram de animais do gênero *Alouatta* (42,9%; 6 de 14), seguidos por *Callithrix* (35,7%; 5 de 14), *Sapajus* (7,1%; 1 de 14) e *Leontopithecus rosalia* (14,3%; 2 de 14). Os valores do limiar do ciclo de PCR (CT) foram em média 12,23 (variação de 7,2 a 22,4) (Tabela 1).

TABELA 1 Dados epidemiológicos para as amostras sequenciadas

ID	C _T value	Sample type	Host	Species	State	Municipality	Collection date (day/month/year)	Age	Sex	Residence
RJ182	8.2	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	RJ	São Sebastião do Alto	09/03/2017	NA	M	
RJ193	10.2	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	RJ	São Sebastião do Alto	27/03/2017	1	M	
RJ141	22.4	Serum	Human		ES	Ibatiba	24/01/2017	16	M	Rural
RJ183	11.2	Serum	Human		RJ	São Sebastião do Alto	12/03/2017	25	M	Rural
RJ194	6.5	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	RJ	São Sebastião do Alto	27/03/2017	15	F	
RJ147	21.9	Whole blood	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	ES	Domingos Martins	31/01/2017	NA	NA	
RJ173	15	Whole blood	NHP	<i>Cebus</i> sp.	ES	Itarana	09/02/2017	NA	NA	
RJ184	14.4	Liver	Human		ES	Cariacica	13/03/2017	65	M	Rural
RJ213	8.1	Liver	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Valença	22/01/2018	5	F	
RJ186	10.9	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	ES	Guarapari	06/03/2017	NA	NA	
RJ177	11.5	Serum	Human		ES	Brejetuba	16/02/2017	46	M	Urban
RJ188	9.9	Whole blood	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	ES	Cariacica	08/03/2017	NA	NA	
RJ201	13.4	Liver	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Nova Iguaçu	28/11/2017	2	F	
RJ219	11.2	Kidney	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Angra dos Reis	05/02/2018	NA	NA	
RJ189	13.7	Whole blood	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	ES	Serra	20/03/2017	NA	F	
RJ216	7.2	Liver	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Duas Barras	25/01/2018	10	F	
LABFLA09	22.1	Liver	NHP	<i>Leontopithecus Rosalia</i>	RJ	Silva Jardim	24/04/2018	NA	NA	
LABFLA10	11.76	Liver	NHP	<i>Leontopithecus Rosalia</i>	RJ	Silva Jardim	24/04/2018	NA	NA	

^aID, study identifier; C_T, RT-qPCR quantification cycle threshold value; RJ, Rio de Janeiro; ES, Espírito Santo; Municipality, Municipality of residence; F, female; M, male; NA, not available.

A idade mediana dos pacientes humanos foi de 38 anos (variação de 16 a 65 anos). Um total de 75% dos indivíduos afetados moravam em áreas rurais (Tabela 1).

Apenas um indivíduo morava em uma área urbana com um histórico de viagens para áreas rurais. Para investigar a fonte e transmissão do VFA e a diversidade genética do vírus circulando em humanos e PNHs nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, nós usamos o sequenciador portátil de nanoporos MinION para gerar 18 sequências genômicas completas e quase completas (cobertura média 89,9 %; Tabela 2) usando um protocolo de sequenciamento MinION descrito anteriormente (11, 21) que permitiu a rápida geração de dados através da preparação rápida de amostras e construção da biblioteca (1 dia) como uma abordagem interessante para obter informações críticas rápidas (como a identificação de linhagem e dinâmica de transmissão de patógenos) úteis para serviços de vigilância e tomadores de decisão.

TABELA 2 Estatísticas de sequenciamento para as 18 novas sequências obtidas

Study identifier	NCBI accession no.	No. of mapped reads	Avg depth coverage	No. of bases covered >10x	No. of bases covered >25x	Reference covered (%)
RJ182	MK882607	21,104	961.34	10,220	10,220	99.31
RJ193	MK882613	2,953	133.99	10,215	9,697	95.95
RJ141	MK882601	11,776	523.89	10,175	9,955	96.17
RJ183	MK882608	1,453	67.88	9,934	8,599	82.52
RJ194	MK882615	1,146	55.27	9,381	7,964	79.84
RJ147	MK882602	3,319	148.16	8,461	7,651	71.19
RJ173	MK882599	1,361	63.57	9,017	7,628	74.68
RJ184	MK882609	1,241	57.04	9,480	8,109	78.23
RJ213	MK882618	2,520	116.01	10,206	9,674	93.01
RJ186	MK882610	4,007	190.77	9,460	9,445	90.36
RJ177	MK882604	22,538	1,057.4	10,227	10,219	99.31
RJ188	MK882611	74,369	3,227.15	10,237	10,231	99.31
RJ201	MK882617	8,679	399.91	9,490	9,454	90.34
RJ219	MK882621	8,894	405.58	10,205	9,957	96.2
RJ189	MK882612	4,840	219.19	9,695	9,146	89.4
RJ216	MK882619	6,807	313.58	10,220	9,709	93.1
LABFLA09	MK882600	312,871	4,637.05	10,210	9,975	89.97
LABFLA10	MK882603	470,582	5,028.42	9,693	9,871	99.35

As amostras de FA sequenciadas neste estudo foram distribuídas geograficamente ao longo de 6 municípios do Rio de Janeiro e 7 no Espírito Santo (Fig. 1A).

A figura 1B mostra o número de casos confirmados do VFA nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Os dados epidemiológicos revelaram duas ondas epidêmicas distintas do VFA. A primeira onda epidêmica (onda 1) é representada pelos casos do VFA registrados principalmente no estado do Espírito Santo durante o primeiro semestre de 2017 (janeiro a abril; n=252 casos), embora alguns casos esporádicos tenham sido relatados no ano seguinte (fig. 1B). A segunda onda (onda 2) é representada por casos do VFA registrados no estado do Rio de Janeiro durante o primeiro semestre de 2018 (fevereiro a maio; n=220 casos) (Fig. 1B). Embora a maioria dos casos no Rio de Janeiro tenha ocorrido entre fevereiro e março de 2018, também houve uma reemergência do VFA naquele estado detectada por volta de março de

2017 durante a onda epidêmica 1 que afetou principalmente o estado do Espírito Santo.

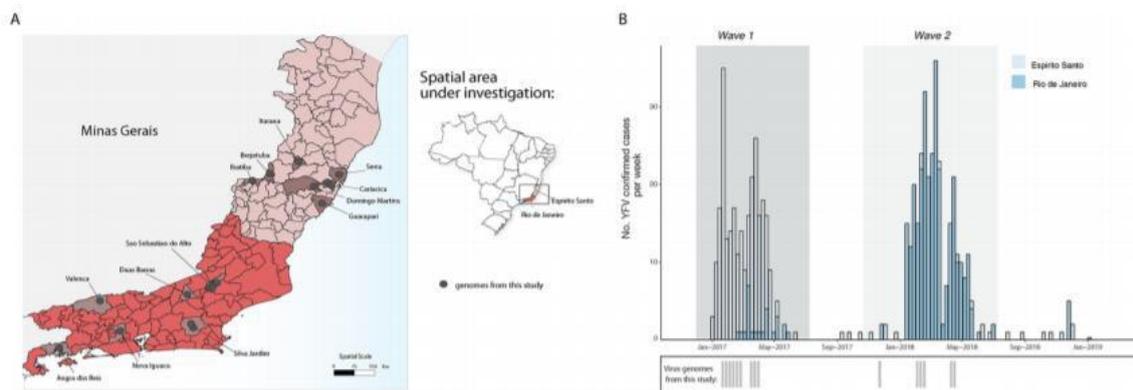


FIG 1 Distribuição espacial e temporal dos casos de FA dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro durante 2017 e Santo (ES) e Rio de Janeiro (RJ), localizados na região sudeste do Brasil e seus municípios. Os círculos indicam onde as amostras deste estudo foram coletadas. (B) Séries temporais de casos do VFA humano (H) e primatas não-humanos nos estados ES e RJ confirmados por sorologia, PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-qPCR) ou isolamento de vírus. Abaixo, as datas de coleta das amostras dos genomas de vírus gerados neste estudo são mostradas em barras cinza.

História genética do VFA no sudeste do Brasil.

Para investigar a relação filogenética das cepas do VFA circulando nos estados do sudeste (Espírito Santo e no Rio de Janeiro), nós estimamos uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) para um conjunto de dados de 181 sequências de referência que compreendem as quatro linhagens do VFA. Nossa filogenia de ML revelou que, como se suspeita, as sequências do VFA recém-geradas pertencem à linhagem da América do Sul I (SA1) com alto suporte estatístico (bootstrap 100%), agrupando-se com outros isolados brasileiros da epidemia entre 2016 a 2019 (Fig. 2).

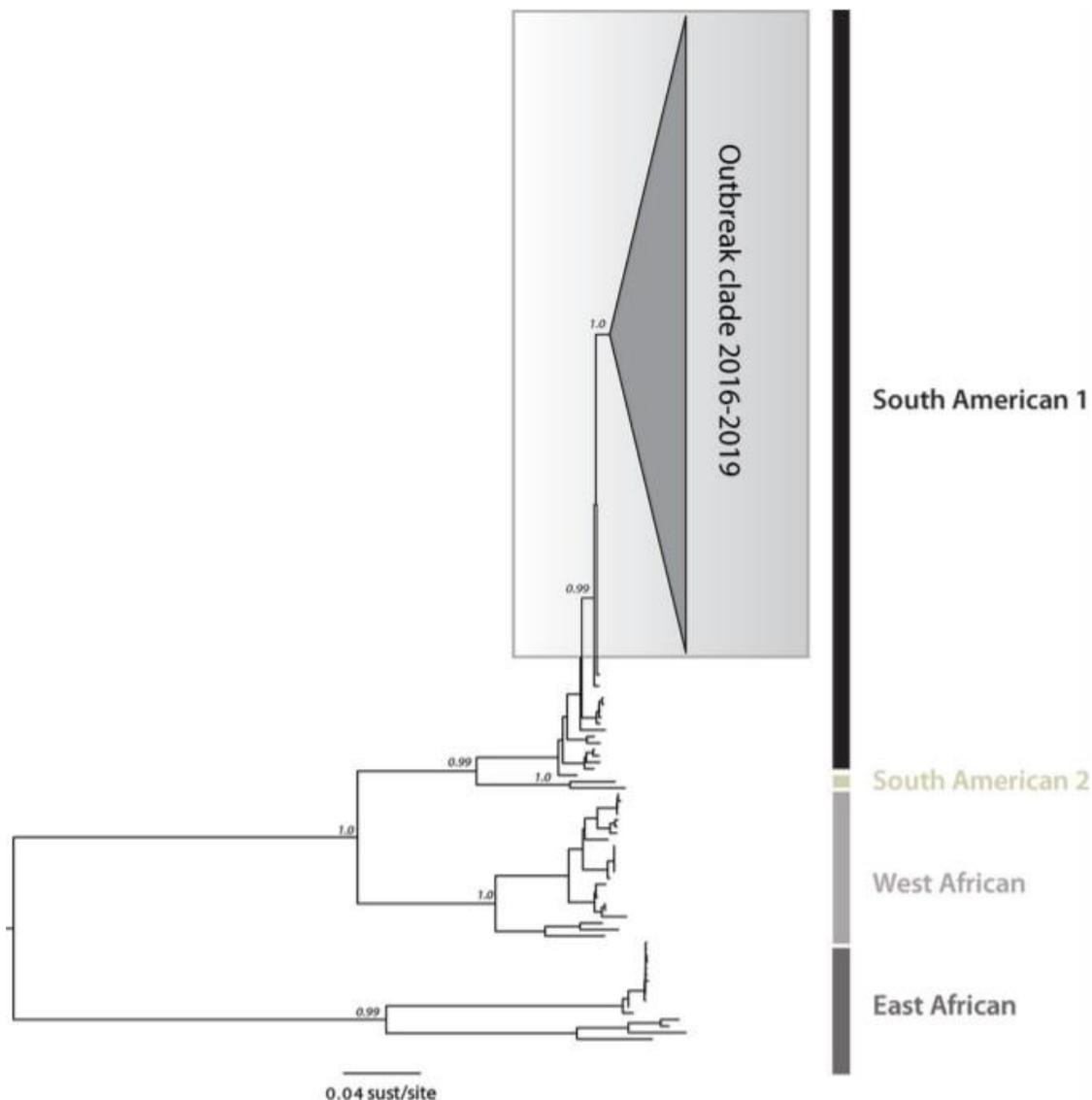


FIG 2 Filogenética molecular da epidemia brasileira do VFA. Filogenia de probabilidade máxima de genomas completos do VFA mostrando o clado de surto (triângulo cinza) dentro do genótipo Sul-Americano I (SA1). A barra de escala está em unidades de substituições por site (sust / site).

Posteriormente, para investigar a dinâmica da epidemia do VFA na região sudeste, foram realizadas análises genéticas em um segundo conjunto de dados (conjunto de dados 2; n=137), incluindo sequências recentemente publicadas da epidemia do VFA no Brasil entre 2016 a 2019, pertencentes à linhagem SA1. A escala temporal de nossas estimativas filogenéticas foi consistente com estudos recentes (17, 22, 23) e confirmou a presença de duas linhagens distintas circulando na atual epidemia do VFA, denominada a seguir como linhagem 1 do SA1 e linhagem 2 do SA1 (Fig. 3). A linhagem SA1 1 compreende sequências das regiões norte e leste dos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, e a época do ancestral comum mais recente (TMRCA) dessa linhagem foi datada de setembro de

2016 (95). % Intervalo credível bayesiano [BCI]; julho a novembro de 2016). A linhagem 2 do SA1 compreende sequências dos municípios do sul de Minas Gerais e sequências do sudeste de São Paulo e a TMRCA dessa linhagem foi datada de aproximadamente julho de 2016 (95% BCI; junho a dezembro de 2016) (Fig. 3). Nossa filogenia em escala de tempo mostrou que as sequências geradas neste estudo se agruparam com alto suporte (probabilidade posterior [pp] 90%) dentro da linhagem 1 do SA1 (Fig. 3).

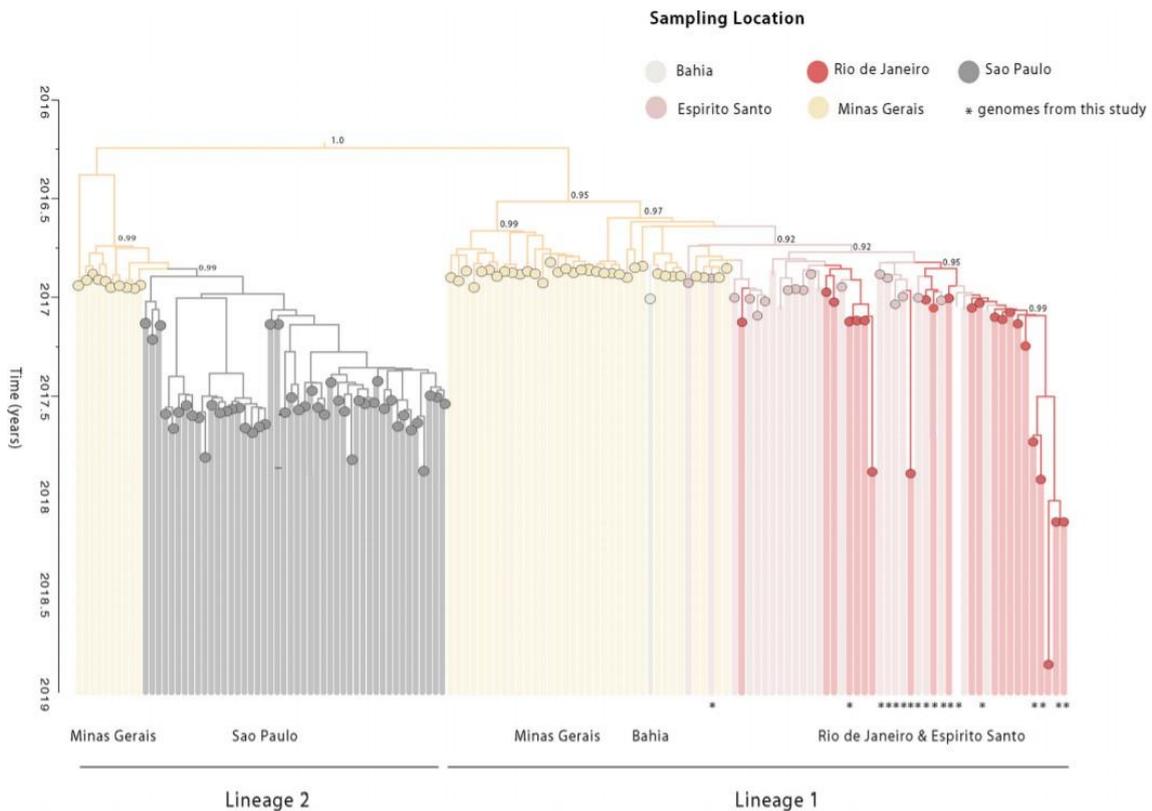


FIG 3 Árvore filogenética em escala temporal da atual epidemia de FA no Brasil. Filogenia do relógio molecular obtida pela combinação dos 18 novos genomas completos do VFA gerados aqui (dicas com estrela) juntamente com os dados disponíveis ao público (n 137) da epidemia do VFA no Brasil entre 2016 a 2019 (11, 12, 17, 22, 23). Os números nos nós representam a probabilidade posterior do clado de 0,90. As cores das ramificações representam diferentes locais de amostragem.

Para entender a transmissão e a evolução espaço-temporal da linhagem 1 da SA1, analisamos um subconjunto de 80 sequências (conjunto de dados 3) representando todas as sequências disponíveis nesta linhagem (Fig. 4). Realizamos uma regressão da divergência genética da raiz para a ponta em relação às datas de amostragem que confirmaram sinal temporal suficiente (r^2 0,70) neste conjunto de dados. Uma análise filogenética em escala temporal usando uma estrutura de Monte Carlo (MCMC) da cadeia Bayesian-Markov (24) foi realizada para investigar o tempo

de introdução do VFA nos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro (Fig.5A). A Figura 5A mostra um zoom da filogenia bayesiana em escala temporal, destacando a linhagem 1 da SA1, compreendendo as linhagens de VFA de 2017 a 2019 dos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Nossa análise mostrou que amostras do Espírito Santo foram misturadas com sequências do Rio de Janeiro. Isso sugere que as epidemias de YF no Espírito Santo e no Rio de Janeiro não foram causadas por um único evento de introdução, como observado em São Paulo (17, 22), mas resultou de várias introduções do vírus ao longo do tempo.

Em seguida, nós usamos um modelo de difusão contínua para investigar como a linhagem 1 do SA1 está se espalhando no espaço e no tempo. Nós encontramos evidências de que o VFA se disseminou pelos estados do sudeste brasileiro usando dois caminhos distintos com uma taxa de dispersão média de 0,12 km / dia (95% de alta densidade posterior [HPD], 0,09 a 0,14 km / dia). A partir da região norte do estado de Minas Gerais, o VFA se espalhou para a região sul do estado da Bahia por volta de janeiro de 2017 (95% BCI, de dezembro de 2016 a fevereiro de 2017) (Fig. 5) e da região leste do estado de Minas Gerais, o VFA mudou em direção ao estado do Espírito Santo (pp 0,99), com introduções estimadas em janeiro de 2017 (95% BCI, novembro de 2016 a janeiro de 2017) (Fig. 5A e B). Desde sua introdução no estado do Espírito Santo, o vírus se espalhou pelo estado vizinho (Fig. 5). Nossas análises revelaram que o VFA provavelmente foi introduzido no estado do Rio de Janeiro várias vezes entre janeiro (95% BCI, dezembro de 2016 a fevereiro de 2017) e março de 2017 (fevereiro de 2017 a maio de 2017), sendo espalhando para o sul a partir da fronteira com o Espírito Santo e alcançando o município de Angra dos Reis, que é localizado na região sul do Rio de Janeiro. Nossos dados sugerem ainda que, após sua primeira introdução no Rio de Janeiro, o vírus persistiu até 2019, conforme indicado pelo isolado MK533792 amostrado no município de Casimiro de Abreu em janeiro de 2019 (12) (Fig. 5A), reforçando a necessidade de manutenção vigilância contínua e alta cobertura vacinal na região sudeste.

Sampling Location

- Minas Gerais
- Bahia
- Espírito Santo
- Rio de Janeiro

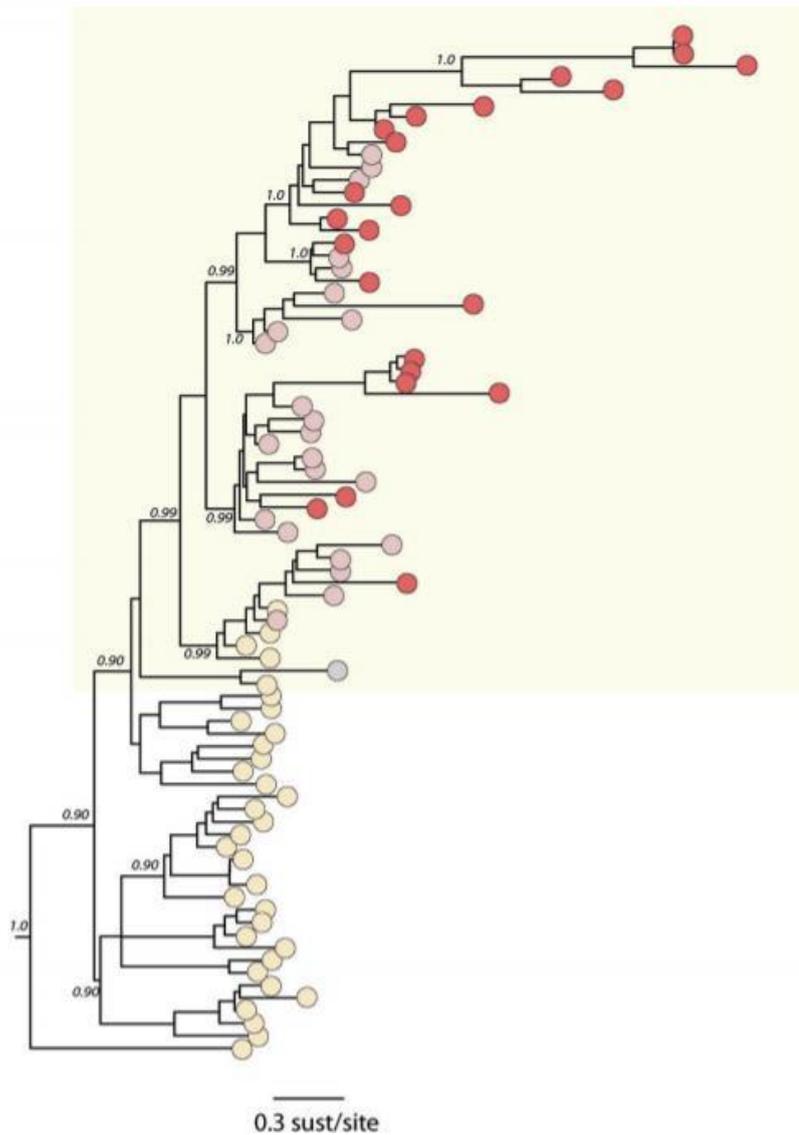


FIG 4 Filogenia de relógio molecular incluindo o clado que compreende os novos isolados mais todas as cepas do VFA do surto de 2017 a 2019 pertencentes ao clado da linhagem 1 do SA1. Os números ao longo dos ramos representam probabilidade posterior do clado de 0,90. As cores representam locais diferentes.

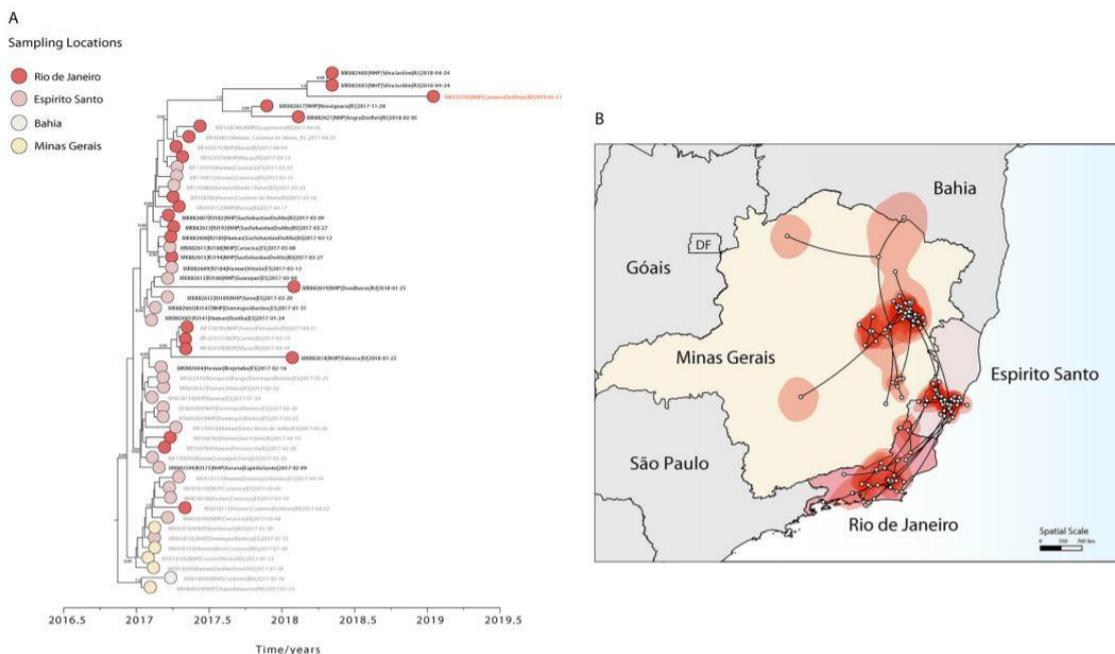


FIG 5 Dinâmica espaço-temporal da linhagem 1 do SA1 do VFA. (A) Filogenia do relógio molecular incluindo o clado que compreende as linhagens do VFA de 2017 a 2019 dos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro pertencentes à linhagem 1 do SA1 do VFA. Os números ao longo dos ramos representam probabilidade posterior do clado de 0,90. Os isolados do VFA de Casimiro de Abreu, amostrados em janeiro de 2019, estão destacados em vermelho. As cores representam locais diferentes. (B) Difusão contínua espaço-temporal reconstruída do clado de surto da linha 1 do SA1 do VFA. Os ramos filogenéticos são mapeados no espaço de acordo com a localização dos nós filogenéticos (círculos). As linhas mostram o movimento entre os estados do vírus de Minas Gerais, seguido pelo movimento para os estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro. As regiões sombreadas mostram regiões credíveis a 95% dos nós internos.

DISCUSSÃO

Neste estudo, nós geramos e analisamos 18 novas sequências genômicas completas e quase completas de VFA de amostras de humanos e primatas não-humanos coletadas em vários municípios não cobertos por outros estudos anteriores nos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro em 2017 e 2018.

Embora estudos anteriores já tenham mostrado a dinâmica espacial e evolutiva do atual surto de VFA no Brasil (11, 12, 17, 22), a escassez de dados genômicos dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro dificultou a capacidade de esclarecer mais sobre o reemergência e estabelecimento da transmissão do VFA nessas regiões. Tentar determinar em larga escala o corredor de propagação do VFA e os pontos de acesso geográficos é essencial para prever e impedir outros possíveis eventos de transbordamento. Os dados genômicos gerados fornecem uma compreensão mais detalhada da introdução e progressão da linhagem 1 do SA1 do VFA e revelam o

momento, a fonte e as rotas prováveis da transmissão e dispersão do vírus da febre amarela durante o maior surto no Brasil em décadas.

De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, a reemergência do VFA nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro foram confirmadas em janeiro e fevereiro de 2017, respectivamente (13–15).

Nossas estimativas indicaram que as cepas do VFA da epidemia emergiram primeiro nos estado do Espírito Santo de Minas Gerais por volta de janeiro de 2017 (95% BCI, novembro de 2016 a janeiro de 2017), o que é consistente com dados epidemiológicos (13–15). Do estado do Espírito Santo, o VFA se espalhou para o sul, para a grande área metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Além disso, nossos dados indicaram que a circulação do VFA no Rio de Janeiro pode ter resultado de eventos de introdução múltiplos e independentes do estado do Espírito Santo, destacando uma dinâmica de dispersão complexa do atual surto do VFA no Brasil, que ocorreu entre janeiro (95% BCI, Dezembro de 2016 a fevereiro de 2017) e março de 2017 (fevereiro de 2017 a maio de 2017). Nossos dados sugerem ainda que, após sua primeira introdução no Rio de Janeiro, o vírus persistiu até 2019, conforme indicado pelo isolado MK533792 amostrado no município de Casimiro de Abreu em janeiro de 2019 (12). Essa estimativa sugere que o VFA pode ter persistido no estado do Rio de Janeiro por aproximadamente 24 meses. Isso sugere que o estado do Rio de Janeiro possua condições ecológicas para manter o VFA fora do período de transmissão (dezembro a maio) (12). Por fim, dada a abundância de vetores competentes silvestres (12) e primatas não-humanos (22, 23), esses dados podem indicar que existe algum potencial para o estabelecimento de um ciclo de transmissão enzoótica da febre amarela na Mata Atlântica.

Os dados epidemiológicos também indicaram duas ondas epidêmicas distintas do VFA (13, 14). A primeira onda epidêmica é representada pelos casos do VFA registrados principalmente nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo durante o primeiro semestre de 2017, enquanto a segunda onda é representada pelos casos do VFA registrados no estado do Rio de Janeiro durante o primeiro semestre de 2018. A transmissão do VFA em áreas com espécies de PNH suscetíveis ocorre tipicamente em períodos caracterizados por condições ambientais adequadas para suportar maior abundância de mosquitos (12, 25).

Como sugerido anteriormente (17), encontramos evidências sobre a circulação de duas linhagens distintas do VFA que podem ter se espalhado a distintas taxas

evolutivas e de difusão. Usando dados genéticos do VFA, nós estimamos que a linhagem 1 do SA1 do VFA se espalha a uma taxa de 0,12 km / dia (HPD a 95%, 0,09 a 0,14 km / dia), o que é um pouco abaixo das estimativas anteriores (11, 17). Isso pode ser devido ao conjunto maior de dados analisados neste estudo, que pode explicar as diferenças na taxa de propagação do VFA entre diferentes áreas, bem como diferentes linhagens.

Esses achados reforçam a ideia de que são necessárias estratégias contínuas de vigilância genômica para auxiliar no monitoramento e entendimento das epidemias de arbovírus, o que pode ajudar a atenuar os impactos na saúde pública de doenças infecciosas. No presente artigo de pesquisa, nós objetivamos fornecer informações genômicas e reforçar a ideia do uso de dados epidemiológicos e genômicos gerados por um sistema de sequenciamento portátil e fácil de configurar como uma abordagem para obter informações críticas rápidas (como identificação de linhagem e patógeno) dinâmica de transmissão) que podem ser usadas por serviços de vigilância e tomadores de decisão.

Neste estudo, nós também demonstramos que por meio da análise de conjuntos de dados heterocrônicos com amostras coletadas em diferentes momentos e / ou locais, a filodinâmica se torna uma ferramenta poderosa para prevenir e identificar movimentos de linhagens virais e descrever tendências de disseminação epidêmica (11, 26, 27)

A vigilância continuada em seres humanos e primatas não-humanos (PNH) em períodos não epidêmicos na região sudeste será importante para quantificar o risco de novos surtos e o estabelecimento de novos ciclos de transmissão de VFA na região. Em conclusão, nosso estudo mostra que os dados genômicos gerados pela tecnologia de sequenciamento portátil podem ser empregados para auxiliar os serviços de saúde pública no monitoramento e compreensão da diversidade dos vírus circulantes transmitidos por mosquitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de amostras.

Amostras de primatas humanos e não-humanos foram coletadas sob as diretrizes de uma estratégia nacional de vigilância da FA para diagnóstico molecular pelo Laboratório de Flavivírus (LABFLA) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio

de Janeiro, Brasil, que é um laboratório referência regional do Ministério da Saúde para arbovírus. A maioria das amostras foi vinculada a um registro digital que coletou dados epidemiológicos e clínicos, como data da coleta, município de residência, bairro de residência, características demográficas (idade e sexo) e data de início dos sintomas clínicos.

Declaração ética.

O projeto foi apoiado pela Organização Mundial da Saúde Pan-Americana (OPAS) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) como parte dos esforços de vigilância genômica arboviral nos termos da Resolução 510/2016 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Ministério) da Saúde; Comitê Nacional de Ética em Pesquisa, Ministério da Saúde). O diagnóstico da infecção pelo VFA no LABFLA foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz (CAAE90249218.6.1001.54248).

RT-qPCR.

O RNA total foi extraído das amostras de tecido e soro usando um kit de RNA / DNA do patógeno MagMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi detectado usando duas técnicas de RT-qPCR publicadas anteriormente (19, 20).

Síntese de cDNA e sequenciamento de nanoporos de todo o genoma. Tentou-se o sequenciamento nas 18 amostras positivas para RT-PCR selecionadas, independentemente do valor da CT, como descrito anteriormente (11, 21, 27). Todas as amostras positivas foram submetidas a um protocolo de síntese de cDNA (11, 21) usando um kit de síntese de cDNA da primeira fita ProtoScript II. Em seguida, tentou-se uma PCR multiplex de ladrilhos usando o esquema iniciador de VFA publicado anteriormente e 30 ciclos de PCR usando a polimerase de DNA de alta fidelidade Q5 (NEB), conforme descrito anteriormente (21). Os amplicons foram purificados usando esferas 1 AMPure XP (Beckman Coulter) e as concentrações de produtos de PCR limpos foram medidas usando um kit de teste de alta sensibilidade (HS) de DNA de fita dupla Qubit (dsDNA) em um fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher). A preparação da biblioteca de DNA foi realizada usando o kit de sequenciação Ligation (Oxford Nanopore Technologies) e o kit de código de barras Native (NBD103; Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). Uma biblioteca de sequenciamento foi gerada a partir dos produtos com código de barras usando o kit de sequenciamento

de DNA genômico SQK-MAP007 / SQK-LSK208 (Oxford Nanopore Technologies). A biblioteca de sequenciamento foi carregada em uma célula de fluxo R9.4 (Oxford Nanopore Technologies).

Geração de sequências de consenso.

Sequências de consenso para cada amostra com código de barras foram geradas seguindo uma abordagem publicada anteriormente (21). Resumidamente, os arquivos brutos foram chamados em base usando Albacore, desmultiplexados e aparados usando Porechop e depois mapeados com bwa para um genoma de referência (número de acesso ao GenBank JF912190). A chamada de variante nanopolítica foi aplicada ao conjunto para detectar variantes de nucleotídeo único no genoma de referência. Sequências de consenso foram geradas; os locais de ligação ao primer não sobrepostos e os sites com cobertura 20 foram substituídos pelo código de ambiguidade N. As estatísticas de sequenciamento podem ser encontradas na Tabela 1.

Agrupamento de conjuntos completos de dados do genoma do VFA.

A genotipagem foi realizada pela primeira vez usando a ferramenta de tipagem filogenética da febre amarela disponível em <http://www.krisp.org.za/tools.php>. As sequências de genoma geradas aqui foram combinadas com um conjunto de dados que compreende genomas publicados anteriormente da epidemia do VFA no Brasil entre 2016 a 2019 (11, 12, 17, 22, 23). Dois conjuntos de dados genômicos do VFA completos ou quase completos foram gerados. O conjunto de dados 1 (n=199) compreendeu os dados relatados neste estudo (n=18) mais (n=181) sequências genômicas completas ou quase completas de VFA (10.000 pb) recuperadas do NCBI em junho de 2019 e cobrindo todos os quatro genótipos existentes. Posteriormente, para investigar a dinâmica da infecção pelo VFA na região sudeste, foram realizadas análises genéticas em um conjunto de dados menor (conjunto de dados 2), incluindo um conjunto de dados maior e atualizado a partir de dados recentemente divulgados da epidemia do VFA no Brasil entre 2016 a 2019, que pertenciam à linhagem 1 SA1 (n=137). Portanto, para entender a transmissão e a evolução espaço-temporal da linhagem 1 do SA1 do VFA a partir desse conjunto de dados, geramos um subconjunto (conjunto de dados 3) que inclui todas as sequências identificadas dessa linhagem (n=80). As árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) foram estimadas usando RAxML (28) sob um modelo de substituição de nucleotídeos GTR 4. O suporte

estatístico para nós filogenéticos foi estimado usando uma abordagem de bootstrap ML com 1.000 repetições.

Para investigar o sinal temporal em nossos conjuntos de dados 2 e 3 do VFA, regressamos as distâncias genéticas raiz a ponta dessa árvore ML em relação às datas de coleta de amostras usando TempEst v.1.5.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) (29).

Filogenética datada.

Para estimar as filogenias calibradas no tempo, datadas dos dados do genoma, foram realizadas análises filogenéticas usando um pacote de software Bayesiano (24). Aqui, usamos o modelo de substituição de nucleotídeos GTR 4 e a árvore Bayesian Skygrid anterior (30) com um relógio relaxado não correlacionado com uma distribuição lognormal (31). Empregamos uma análise rigorosa de seleção de modelos usando procedimentos de amostragem de caminho (PS) e trampolim (SS) para estimar o modelo de relógio molecular mais apropriado para a análise filogenética bayesiana. Testamos (i) o modelo de relógio molecular estrito, que assume uma taxa única em todos os ramos da filogenia e (ii) o modelo de relógio molecular relaxado não correlacionado mais flexível com uma distribuição de taxa lognormal (lognormal não correlacionado [UCLN]). Os estimadores SS e PS indicaram o relógio molecular estrito (fator 4.3 de Bayes) como o modelo mais adequado ao conjunto de dados em análise. As análises foram realizadas em duplicado no BEAST v.1.10.4 (24) para 50 milhões de etapas do MCMC, parâmetros de amostragem e árvores a cada 5.000 passos. Foi utilizada uma referência não-informativa da cadeia de Markov no tempo contínuo antes da taxa de relógio molecular (32). A convergência das cadeias MCMC foi verificada usando o Tracer v.1.7.1 (33). O máximo de árvores do clado foi resumido usando o TreeAnnotator após descartar 10% como queima.

Análises filogeográficas.

Para investigar a disseminação do VFA no sudeste do Brasil, analisamos mais detalhadamente a linhagem 1 do SA1, que inclui as sequências n 80 (Fig. 4). Utilizamos uma árvore coalescente Skygrid anterior (30) e um modelo filogeográfico contínuo que utiliza uma caminhada aleatória relaxada para modelar a difusão espacial de linhagens. A variação da velocidade de dispersão entre linhagens foi modelada usando uma distribuição de Cauchy (34, 35). A difusão do vírus através do tempo e do espaço foi resumida usando 1.000 filogenias amostradas em intervalos

regulares a partir da distribuição posterior (após exclusão da queima). Os locais de amostragem de cada sequência georreferenciada do VFA dos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro estão listados na Tabela S1 no material suplementar. As sequências georreferenciadas e com registro de data e hora foram analisadas no BEAST v.1.10.4 (24) usando a biblioteca BEAGLE (36) para aumentar a velocidade computacional.

6 – CONCLUSÃO / CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A cooperação da OPAS na epidemia de FA demonstra que a organização não tem seu fim em si mesma e mostra a materialização da sua missão de “promover a equidade na saúde, combater doenças, melhorar a qualidade de vida e elevar a expectativa de vida dos povos das Américas”. Deste modo, é inerente ao papel da OPAS, explicitado no RSI, o fortalecimento das capacidades dos países. Muitas das formas de cooperação da OPAS são discretas, voltadas para o fortalecimento institucional do Ministério da Saúde e de restrita divulgação, o que limita a sistematização de todas as atividades realizadas pela Organização.

A crise de abastecimento de imunobiológicos levou à necessidade de uso de doses fracionadas da vacina e de grandes negociações na aquisição de doses e seringas. Esta crise revela a importância de o Brasil garantir a soberania na fabricação de imunobiológicos, capacidade básica essencial no enfrentamento de doenças imunopreveníveis, sejam emergentes ou reemergentes.

A resposta a essa emergência em saúde congregou a expertise de cientistas de diferentes campos disciplinares, envolvendo aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos, laboratoriais e políticas públicas, configurando uma equipe multidisciplinar e pluri-institucional. Cabe ressaltar que a capacidade instalada de pesquisa no Brasil foi decisiva para garantir a resposta, com destaque para a Fiocruz e o Instituto Evandro Chagas, órgãos federais que têm como missão produzir, disseminar e compartilhar conhecimentos e tecnologias que contribuam para a promoção da saúde e da qualidade de vida da população brasileira. Além da geração de conhecimento, a Fiocruz também é responsável pela produção de imunobiológicos e testes diagnósticos. Essas instituições atuam como Centros Colaboradores da Organização Mundial de Saúde³².

A cooperação internacional foi fundamental no enfrentamento à epidemia de FA, desde sua notificação para a OPAS/OMS e acompanhamento dos países membros da Organização das Nações Unidas, como para a resposta à emergência. Essa passa por decisões de gestão complexas, como o ajuste no esquema vacinal, que carecem de forte embasamento técnico e político-institucional, e pelo apoio na aquisição de insumos estratégicos. Este exemplo de cooperação técnica multilateral mostra o papel dos

organismos Internacionais e o êxito no seguimento do Regulamento Sanitário Internacional como instrumento norteador na resposta às Emergências de Saúde Pública.

Em relação à geração de conhecimento para a tomada de decisão, a OPAS facilitou a vigilância genômica da Febre Amarela com foco nas questões de vigilância, principalmente para a busca de evidências que respondessem aos questionamentos do tipo de transmissão (silvestre ou urbana) e conseqüentemente facilitar as ações de controle da epidemia, bem como a caracterização da epidemia e o entendimento de sua evolução.

Fiel a sua missão de “promover a equidade na saúde, combater doenças, melhorar a qualidade de vida e elevar a expectativa de vida dos povos das Américas”, a OPAS não mediu esforços para o apoio no enfrentamento da maior epidemia de febre amarela silvestre já registrada¹².

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ministério da Saúde. *Informe 1- Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil-2017/2018 MONITORAMENTO DA SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA FEBRE AMARELA NO BRASIL*. (2017).
2. Ministério da Saúde. *Informe 27 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil-2017/2018 MONITORAMENTO DA SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA FEBRE AMARELA NO BRASIL**. (2018).
3. Fernando da Costa Vasconcelos, P. *Febre amarela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **36**, (2003).
4. Simmonds, P. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2–3 (2017).
5. Leão, R. N. Q. de, Bichara, C. N. C., Fraiha Neto, H. & Vasconcelos, P. F. da C. *Medicina tropical e infectologia na Amazônia. v.1. 1*, (Samauna Editorial, 2013).
6. Couto-Lima, Di. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
7. Instituto Evandro Cha. Instituto Evandro Chagas detecta vírus da Febre Amarela em mosquito Aedes albopictus no Brasil - Portal IEC. (2018). Available at: <https://www.iec.gov.br/descoberta/>. (Accessed: 26th October 2020)
8. Possas, C. *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, (2018).

9. Organization, W. H. *Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE). Strategy Partners meeting report.* (2018).
10. Salud, O. P. de la. *Pro salute Novi Mundi: historia de la Organización Panamericana de la Salud.* (1992).
11. Organização Pan-americana da Saúde. OPAS/OMS Brasil - Banco de Noticias - Brasil anuncia fracionamento de doses de vacina contra febre amarela em três estados. (2018). Available at:
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5575:brasil-anuncia-fracionamento-de-doses-de-vacina-contra-febre-amarela-em-tres-estados&Itemid=820. (Accessed: 24th October 2020)
12. Organização Pan-americana da Saúde. OPAS/OMS colabora com governo brasileiro e Espírito Santo na resposta ao surto de febre amarela. (2017). Available at:
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5389:opas-oms-colabora-com-governo-brasileiro-e-espírito-santo-na-resposta-ao-surto-de-febre-amarela-2&Itemid=812. (Accessed: 26th October 2020)
13. Organización Panamericana de la Salud. *Alerta Epidemiológica Fiebre amarilla.* (2017).
14. Faria, N. R. *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* (80-.). **361**, 894–899 (2018).
15. Giovanetti, M. *et al.* Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. *jvi.asm.org 1 J. Virol.* **94**, 1623–1642 (2020).
16. Goes de Jesus, J. *et al.* Yellow fever transmission in non-human primates, Bahia, Northeastern Brazil. (2020). doi:10.1371/journal.pntd.0008405
17. Rother, E.T. Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta paul. enferm.* **20**, (2007).
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviço. *Guia de Vigilância em Saúde: volume único.* (2017).
19. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação.* (2014).
20. Rezende, J. M. de. *À sombra do Plátano: crônicas de história da medicina.* (Editora Fap-Unifesp, 2009). doi:10.7476/9788561673635
21. de Andrade, R. *et al.* *Contágio: história da prevenção das doenças*

transmissíveis 1 Esta é uma versão eletrônica do texto do livro: CONTÁGIO: HISTÓRIA DA PREVENÇÃO DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. (1997).

22. Santos, R. P. O termo hemorróidas na Bíblia. *J. Bras. Med.* **12**, 511–513 (1967).
23. Lívio, T. *Ab Urbe Condita*. (1989).
24. Keele, K. D. THE SYDENHAM-BOYLE THEORY OF MORBIFIC PARTICLES*. *Med. Hist.* **18**, 240–248 (1974).
25. Barata, R. de C. B. Epidemias. *Cad. Saude Publica* **3**, 9–15 (1987).
26. Snow, J. Review of Snow's Mode of Communication of Cholera. *Br. Foreign Med. Rev.* **April**, 449–463 (1855).
27. Lima, N. T. *O BRASIL E A ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: UMA HISTÓRIA EM TRÊS DIMENSÕES*. (2002).
28. Ventura, D. Saúde pública e política externa brasileira. *Rev. Int. direitos humanos* **10**, 99–118 (2013).
29. Clemow, F. G. The international health organization of the league of nations. *British Medical Journal* **1**, 798 (1924).
30. Brown, T. M., Cueto, M. & Fee, E. A transição de saúde pública 'internacional' para 'global' e a Organização Mundial da Saúde. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* **13**, 623–647 (2006).
31. League of Nations Health Organisation .
32. Costa, Z. G. A., Romano, A. P. M., Elkhoury, A. N. M. & Flannery, B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* **2**, 11–26 (2011)

ANEXO 1
Ficha de Notificação / Investigação de Febre Amarela

República Federativa do Brasil
Ministério da Saúde

SINAN
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE FEBRE AMARELA

Nº

CASO SUSPEITO: indivíduo com quadro febril aguda (até 7 dias), de início súbito, acompanhado de icterícia e/ou manifestações hemorrágicas, residente ou procedente de área de risco para febre amarela ou de locais com ocorrência de epizootias em primatas não humanos ou isolamento de vírus em vetores, nos últimos 15 dias, não vacinados contra febre amarela ou com estado vacinal ignorado.

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2 - Individual		
	2 Agravado/enferma	FEBRE AMARELA		3 Data da Notificação
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (CID10) A 9 5.9	Código (IBGE)
Dados de Residência	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código	7 Data dos Primeiros Sintomas	
	8 Nome do Paciente	9 Data de Nascimento		
	10 (ou) Idade	11 Sexo	12 Gestante	13 Raça/Cor
Dados de Residência	14 Escolaridade	15 Número do Cartão SUS		
	17 UF	18 Município de Residência	Código (IBGE)	19 Distrito
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida, ...)	Código	
Dados Complementares do Caso	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)	24 Geo campo 1	
	25 Geo campo 2	26 Ponto de Referência	27 CEP	
	28 (DDD) Telefone	29 Zona	30 País (se residente fora do Brasil)	
Antecedentes Epidemiológicos	31 Data da Investigação	32 Ocupação		
	33 Informar os dados da investigação entomológica (mosquitos) e de epizootias			
	34 Vacinado Contra Febre Amarela			
Dados Clínicos	35 Caso Afirmativo, Data			
	36 UF			
	37 Município			
Atendimento	38 Unidade de Saúde			
	39 Sinais e Sintomas			
	40 Ocorreu Hospitalização?			
Dados de Laboratório	41 Data da Internação			
	42 UF			
	43 Município			
44 Unidade de Saúde				
45 Exames inespecíficos (anotar o maior valor encontrado, independente da data de coleta)				
Bilirrubina Total _____ mg/dl AST (TGO) _____ UI				
Bilirrubina Direta _____ mg/dl ALT (TGP) _____ UI				

Febre Amarela

Sinan NET

SVS 17/01/2011

ANEXO 2

Ficha de Notificação / Investigação de Epizootia

República Federativa do Brasil
Ministério da Saúde

SINAN
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE NOTIFICAÇÃO/ INVESTIGAÇÃO **EPIZOOTIA**

Nº

Definição do caso: Animal ou grupo de animais encontrados doentes e/ou mortos, incluindo ossadas, sem causa definida, que podem preceder a ocorrência de doenças em humanos

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2- Individual		3 Data da Notificação			
	2 Agravo/doença EPIZOOTIA			3 Data da Notificação		
	4 UF	5 Município de Notificação		Código (IBGE)		
Dados de Ocorrência	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7 Data do início da epizootia		
	8 Fonte da informação			9 (DDD) Telefone da fonte da informação		
	10 UF	11 Município de Ocorrência		Código (IBGE)	12 Distrito	
	13 Bairro		14 Logradouro (rua, avenida, ...)		Código	
	15 Número		16 Complemento (apto., casa, ...)		17 Geocampo 1	
	18 Geocampo 2		19 Ponto de Referência		20 CEP	
	21 (DDD) Telefone		22 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado		23 Ambiente 1-Domicílio 2-Parque, praça ou zoológico 3-Área silvestre 4-Reserva ecológica 5-Outro	
	24 Houve coleta de material para exame laboratorial 1-Sim 2-Não 9-Ignorado			25 Se houve coleta, informar a data		
	26 Se houve coleta, qual material 1-Sim 2-Não 9-Ignorado					
	<input type="checkbox"/> fígado <input type="checkbox"/> rim <input type="checkbox"/> baço <input type="checkbox"/> cérebro <input type="checkbox"/> coração <input type="checkbox"/> fezes <input type="checkbox"/> soro <input type="checkbox"/> sangue total <input type="checkbox"/> outro material Qual: _____					
	27 Animais acometidos				<input type="checkbox"/> Doentes _____ <input type="checkbox"/> Mortos _____	
1-Ave 3-Canino 5-Felino 7-Primata não humano 9-Outros. 2-Bovideo 4-Equideo 6-Morcego 8-Canídeo selvagem Especificar: _____				<input type="checkbox"/> 1ª suspeita diagnóstica <input type="checkbox"/> 2ª suspeita diagnóstica <input type="checkbox"/> 3ª suspeita diagnóstica		
28 Suspeita diagnóstica						
1-Ralva 4-Encefalite Espongiforme Bovina 2-Encefalite Equina 5-Febre Amarela 3-Febre do Vírus do Nilo Ocidental 6-Influenza Aviária 7-Outro. Especificar: _____						
29 Resultado laboratorial 1-Positivo 2-Negativo 3-Inconclusivo 9-Ignorado						
<input type="checkbox"/> Ralva <input type="checkbox"/> Encefalite espongiforme bovina <input type="checkbox"/> Outro Especificar: _____ <input type="checkbox"/> Encefalite equina <input type="checkbox"/> Febre amarela <input type="checkbox"/> Febre do Nilo <input type="checkbox"/> Influenza aviária						

Observações:

Investigador	Município/Unidade de Saúde		Código da Unid. de Saúde
	Nome	Função	Assinatura

Sinan NET SVS 21/06/2008

Fez transfusão de sangue nos últimos 15 dias?		<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Caso afirmativo, data da transfusão ____/____/____			
História prévia de convulsões		<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Caso afirmativo, qual tipo? <input type="checkbox"/> 1 - Convulsão tônico-clônica <input type="checkbox"/> 2 - Convulsão atônica <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado			
Algum EAPV anterior a presente vacinação?		<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Caso afirmativo, qual EAPV anterior?	Caso afirmativo, qual vacina administrada?	Data de ocorrência de EAPV anterior ____/____/____	
Qual a conduta indicada na ocasião deste EAPV anterior?			Fez uso de medicação em EAPV anterior?	Se sim especifique		
			<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	____		
Antecedentes epidemiológicos						
Viajou nos últimos 15 dias?		Viagem		Caso afirmativo, data de ida		
<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		<input type="checkbox"/> 1 - Nacional <input type="checkbox"/> 2 - Internacional País: _____		____/____/____		
Caso afirmativo, data de volta		____/____/____				
UF	Município					
Recebeu vacina(s) para viajar?		Foi vacinado durante a viagem?		Caso afirmativo, data da vacinação		
<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		____/____/____		
Qual(is)?		____				
Dados sobre EAPV						
Manifestações locais	Abscesso fino		Edema		Linfadenomegalia > 3 cm supurada	
	Abscesso com drenagem espontânea		Enduração		Linfadenomegalia não supurada	
	Abscesso quente		Eritema		Rubor	
	Arolos no local de aplicação		Exantema em local diferente da aplicação		Úlcera	
	Calor local		Exantema generalizado		Outras reações locais	
	Cefaléia		Linfadenite não supurada			
	Dor		Linfadenite supurada			
Data de início do(s) sintoma(s)		Tempo entre a aplicação da vacina e a manifestação clínica		Duração do evento		
____/____/____		____ dia(s) ____ hora(s) ____ minuto(s)		____ dia(s) ____ hora(s) ____ minuto(s)		
Manifestações e locais sistêmicas	Pele/Mucosas					
	Angedema de lábios		Cianose		Púrpura	
	Angedema de laringe		Hiperemia e coceira nos olhos		Urticária generalizada	
	Angedema de língua		Ictericia		Urticária no local de aplicação	
	Angedema de membros		Palidez		Outro evento da pele ou mucosas	
	Angedema de olhos		Petequias			
	Angedema generalizado		Prurido			
	Cardiovasculares					
	Hipotensão		Taquicardia		Bradicardia	
	Respiratórias					
	Apréxia		Dor de garganta		Sensação de fechamento de garganta	
	Broncoespasmo/Laringoespasmo		Espasmo		Taquipnéia	
	Dificuldade de respirar		Rinorréia		Tiragem intercostal	
	Dispnéia		Rouquidão		Tosse seca	
	Neurológicas					
	Ataxia		Convulsão tônico-clônica		Paralisia	
	Alteração do nível de consciência		Desmaio		Parestesia	
	Convulsão atônica		Hipotonia		Resposta diminuída a estímulos	
	Convulsão clônica		Letargia		Sinais neurológicos focais ou multifocais	
	Convulsão focal		Não responde a estímulos		Outros eventos neurológicos graves	
Convulsão generalizada		Paralisia de membros inferiores		Outras paralisias		
Gastrointestinais						
Diarreia		Fezes com raras de sangue		Náuseas		
Dor abdominal		Invasão intestinal		Vômitos		
Enterorragia		Melena				
Data de início do(s) sintoma(s)		Tempo entre a aplicação da vacina e a manifestação clínica		Duração do evento		
____/____/____		____ dia(s) ____ hora(s) ____ minuto(s)		____ dia(s) ____ hora(s) ____ minuto(s)		
Outras manifestações	Artralgia		Evidências clínicas de sangramentos		Malícia	
	Artrite		Fadiga		Pancreatite	
	Cefaléia		Febre igual ou maior a 39,5°		Pancreatite	
	Cefaléia e vômito		Febre menor que 39,5°		Soneolência	
	Choro persistente		Hiperemia bilateral nos olhos		Outras	
	Dificuldade de deambular		Hiperemia em articulações			
	Edema articular		Lesões decórmicas de disseminação BCG			
Data de início do(s) sintoma(s)		Tempo entre a aplicação da vacina e a manifestação clínica		Duração do evento		
____/____/____		____ dia(s) ____ hora(s) ____ minuto(s)		____ dia(s) ____ hora(s) ____ minuto(s)		
Atendimento médico						
Recebeu atendimento médico?	Data do atendimento	Caso afirmativo, tipo de atendimento	Ficou em observação?	Ficou em enfermaria?	Ficou em UTI?	Data da alta
<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	____/____/____	<input type="checkbox"/> 1 - Ambulatorial <input type="checkbox"/> 2 - Domiciliar <input type="checkbox"/> 3 - Hospitalar <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado horas	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado dias	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado dias	____/____/____
Nome do local de atendimento					<input type="checkbox"/> 1 - Público <input type="checkbox"/> 2 - privado <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	
Município						UF

Informações laboratoriais complementares					
Tipos de exames (hematologia, bioquímica, líquor, sorologias, isolamento, exames de imagem, histopatologia, outros). Especificar resultados relevantes.					
Hemograma	Data da Coleta ____/____/____				
	Série vermelha	Hemácias mm ³	Hemoglobina	Hematócrito	Plaquetas
	Série branca	Leucócitos mm ³	Monócitos %	Linfócitos %	Neutrófilos % Eosinófilos %
Bioquímica (anotar o maior valor encontrado, independente da data de coleta)	Data da Coleta ____/____/____		Bilirrubina Total mg/dl	Bilirrubina Direta mg/dl	AST (TGO) UI
			Creatinina mg/dl	Provas de Coagulação	ALT (TGP) UI INR PT PTT
Punção Lombar	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado				
	Data da Punção ____/____/____			Cultura do líquor ou Latex <input type="checkbox"/> 1 - Sim Especificar: _____ <input type="checkbox"/> 2 - Não	
	Citoquímica (Líquor)	Leucócitos mm ³	Neutrófilos %	Linfócitos %	Bacterioscopia <input type="checkbox"/> 1 - Sim Especificar: _____ <input type="checkbox"/> 2 - Não
Detecção viral (Especifique o material analisado e o método utilizado para isolamento)	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		Data da Coleta ____/____/____		<input type="checkbox"/> 1 - Sangue <input type="checkbox"/> 2 - Líquor <input type="checkbox"/> 3 - Tecido <input type="checkbox"/> 4 - Outros <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado
	PCR	<input type="checkbox"/> 1 - Positivo <input type="checkbox"/> 2 - Negativo <input type="checkbox"/> 3 - Inconclusivo <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Outros métodos _____		
Realizada Autópsia?	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		Data ____/____/____		
	Anatomo-Patológico	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Data ____/____/____		
	Histopatológico	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Data ____/____/____		
	Imunohistoquímica	<input type="checkbox"/> 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	Data ____/____/____		
ECG	Data do exame ____/____/____	RM	Data do exame ____/____/____		
EEG	Data do exame ____/____/____	ENMG	Data do exame ____/____/____		
RX	Data do exame ____/____/____	USG	Data do exame ____/____/____		
TC	Data do exame ____/____/____				
Informações complementares					
(Descrever apenas informações relevantes que complementem os dados da ficha)					
Diagnóstico					
(Descreva apenas o diagnóstico final com o respectivo CID 10)					
Descrição		Código do CID 10			
Erros programáticos (procedimentos inadequados)					
<input type="checkbox"/> 1 - Tipo de imunobiológico utilizado		<input type="checkbox"/> 6 - Técnica de administração		<input type="checkbox"/> 10 - Não se aplica	
<input type="checkbox"/> 2 - Via de administração		<input type="checkbox"/> 7 - Intervalo inadequado entre doses		<input type="checkbox"/> 11 - Outros - Especificar: _____	
<input type="checkbox"/> 3 - Diluição		<input type="checkbox"/> 8 - Intervalo inadequado entre vacinas			
<input type="checkbox"/> 4 - Conservação		<input type="checkbox"/> 9 - Validade vencida			
<input type="checkbox"/> 5 - Fora da idade recomendada					
Conclusão do caso					
Categoria do evento		Classificação por gravidade		Classificação por causalidade	
<input type="checkbox"/> 1 - Reação vacinal <input type="checkbox"/> 2 - Erro programático <input type="checkbox"/> 3 - Coincidente (associação temporal) <input type="checkbox"/> 4 - Reação no local de aplicação <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado		<input type="checkbox"/> 1 - Não graves (leves e moderados) <input type="checkbox"/> 2 - Grave		<input type="checkbox"/> 1 - Confirmado <input type="checkbox"/> 2 - Provável <input type="checkbox"/> 3 - Possível <input type="checkbox"/> 4 - Descartado (não relacionado) <input type="checkbox"/> 5 - Inconclusivo	
Evolução do caso		Data do óbito ____/____/____		Data de encerramento ____/____/____	
<input type="checkbox"/> 1 - Cura sem sequelas <input type="checkbox"/> 2 - Cura com sequelas <input type="checkbox"/> 3 - Óbito por EAPV <input type="checkbox"/> 4 - Óbito por outras causas <input type="checkbox"/> 5 - Perda de seguimento <input type="checkbox"/> 6 - Não é EAPV		Declaração de Óbito _____ Declaração de nascido vivo _____		Conduta frente ao esquema vacinal <input type="checkbox"/> 1 - Esquema mantido <input type="checkbox"/> 2 - Esquema mantido com precaução (ambiente hospitalar) <input type="checkbox"/> 3 - Contra-indicação com substituição de esquema <input type="checkbox"/> 4 - Contra-indicação sem substituição de esquema <input type="checkbox"/> 5 - Esquema encerrado <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado	
Responsável pelo preenchimento					
Nome		Função		Telefone de contato	
Município					
Unidade de Saúde				Telefone	
Assinatura				Data ____/____/____	

ANEXO 4

Ficha de achados clínicos e coleta de amostras/ necropsia (em PNH)

UZV/CGDT/DEVIT/SVS Ministério da Saúde		FICHA DE ACHADOS CLÍNICOS E COLETA DE AMOSTRAS/ NECROPSIA				Nº				
Local	1	Município	2	UF	3	Localidade	4	Data da Epizootia		
	5	Nome da pessoa de contato			6	Ponto de Referência:				
	7	Endereço			8	Telefone		9	Data de Notificação:	
	10	Geocampo 1			11	Geocampo 2				
	5:				W:					
Características do local onde o animal adoeceu/ morreu	CARACTERÍSTICAS DO LOCAL ONDE O ANIMAL ADOECIU/ MORREU									
	12	Tipo de local: <input type="checkbox"/>								
	1- CETAS 2- Zoológico 3- Residência 4- Área rural 5- Área urbana 6- Área silvestre 7- Outro: _____ 9- N.I.									
Dados do Animal	13	Bioma: <input type="checkbox"/>		14	Se rural, tipo de atividade: <input type="checkbox"/>		15	Apreendido do tráfico? <input type="checkbox"/>		
	1- Amazônia 4- Cerrado 2- Mata Atlântica 7- Pampa 3- Caatinga 6- Pantanal 9- N.I.		1- Pecuária Atividade principal: _____ 2- Agricultura Atividade principal: _____ 3- Outros: _____		1- Sim 2- Não		16 Domesticação? <input type="checkbox"/>			
Dados do Animal	IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL									
	17	Gênero: <input type="checkbox"/>								
	1- Alouatta 2- Ateles 3- Callithrix 4- Cebus 9- N.I. Outro: _____ Espécie: _____									
	18	Sexo: <input type="checkbox"/>		19	Idade: <input type="checkbox"/>		20	Peso: _____ Kg _____ N.I.		
	1- Macho 2- Fêmea 9- N.I.		1- Filhote 2- Juvenil 3- Adulto 4- Senil 9- N.I.							
Dados do Animal	21		Biometria							
	Perímetro torácico: _____ cm		22						Possui microchip? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I.	
	Perímetro encefálico: _____ cm		Nº microchip: _____							
Comprimento do corpo: _____ cm		23						Marcas ou cicatrizes? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I.		
Comprimento da cauda: _____ cm		Local: _____								
Mão direita: _____ cm										
Pé direito: _____ cm										
Pavilhão auditivo direito: _____ cm										
Histórico Clínico	AVALIAÇÃO CLÍNICA DO ANIMAL									
	24	Estado geral do animal: <input type="checkbox"/>		25	Temperatura: _____ °C		26	Presença de ectoparasitas: <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I.		
	1- Bom 2- Regular 3- Ruim 9- N.I.						Sim, qual (s)? _____			
	27	Freq. Cardíaca _____ BPM		28	Freq. Respiratória _____ MPM		29	Hidratação: <input type="checkbox"/>		
					1- Hidratado 2- Desidratado 9- N.I.		30		Dentição 1- Sim 1- Sim 2- Não 2- Não Saúdável <input type="checkbox"/> 9- N.I. Quebrado: <input type="checkbox"/> 9- N.I.	
	31	Data de início dos sintomas		32	Suspeita clínica <input type="checkbox"/>					
					1- Febre Amarela 2- Raiva 3- Herpes 4- Trauma 5- Eletrocutado 6- Outro: _____ 9- N.I.					
	33								Sinais e sintomas: 1- Sim 2- Não 9- Ignorado	
	Febre <input type="checkbox"/>		Respiração ofegante <input type="checkbox"/>		Sialorréia <input type="checkbox"/>		Sinais hemorrágicos <input type="checkbox"/>			
	Se sim: _____ °C									
Conjuntivite <input type="checkbox"/>		Midríase <input type="checkbox"/>		Trismo (mandíbula travada) <input type="checkbox"/>		Incoordenação motora <input type="checkbox"/>				
Letargia <input type="checkbox"/>		Opistótono <input type="checkbox"/>		Bruzismo (ranger dos dentes) <input type="checkbox"/>		Paresia inferior <input type="checkbox"/>				
Depressão/ Apatia <input type="checkbox"/>		Secreção catarral <input type="checkbox"/>		Sonolência <input type="checkbox"/>		Convulsões <input type="checkbox"/>				
Anorexia <input type="checkbox"/>		Secreção nasal <input type="checkbox"/>		Inquietude <input type="checkbox"/>		Tosse <input type="checkbox"/>				
Emagrecimento <input type="checkbox"/>		Espasmos musculares <input type="checkbox"/>		Excitabilidade <input type="checkbox"/>		Lábios fíccios <input type="checkbox"/>				

Histórico Clínico	<input type="checkbox"/> Coriza	<input type="checkbox"/> Tremores	<input type="checkbox"/> Taquicardia	<input type="checkbox"/> Vesículas na boca/língua	
	<input type="checkbox"/> Gengivorragia	<input type="checkbox"/> Epitaxe (Rinorragia)	<input type="checkbox"/> Alopecia	<input type="checkbox"/> Coma	
34 Outros sintomas Especificar: _____		35 Evolução clínica: 1- Cura 2- Morte natural 3- Eutanásia 9- N.I.		36 Data da evolução clínica: _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	
Necropsia	ASPECTOS MACROSCÓPICOS				
	37 Carcaça do animal 1- Ictérica 2- Anêmica 3- Desidratada 4- Hemorrágica 5- Edemaciada 6- Em Autólise 9- N.I.				
	NECROPSIA				
	38 Aspectos macroscópicos observados nas mucosas:				
	Mucosas	Coloração	Secreção	Aspecto	
	Boca				
	Narina				
	Olhos				
	Ouvindo				
	Ânus				
Vulva					
Pênis ou prepúcio					
39 Aspectos macroscópicos observados nos órgãos					
Órgão	Tamanho	Coloração	Aspecto	Consistência	Simetria
Cérebro					
Coração					
Pulmão					
Fígado					
Rim					
Baço					
Estômago					
Intestino					
Tamanho: 1- Normal, 2- Aumentado, 3- Diminuído, 9- N.I. Coloração: 1- Normal, 2- Amarelada, 3- Escurecida, 4- Anêmica, 5- Ictérica, 6- Avermelhada, 7- Esverdeada, 9- N.I. Aspectos: 1- Normal, 2- Liso, 3- Rugoso, 4- Áspero, 5- Granuloso, 6- Necrosado, 7- Hemorrágico, 9- N.I. Consistência: 1- Normal, 2- Macio, 3- Endurecido, 4- Mole, 9- N.I. Simetria: 1- Simétrico, 2- Assimétrico, 9- N.I.					
Material para Laboratório	40 Foi coletado material para pesquisa de vírus/sorologia? <input type="checkbox"/>		41 Se sim, laboratório de encaminhamento da amostra		
	1- Sim 2- Não 9- N.I.		1-IEC 2-IAL 3-FUNED 4-FIOCRUZ 5-LACEN 6-Outro: _____ 9-N.I.		
	42 Tipo de material coletado para pesquisa de vírus/sorologia				
	1- Cérebro 2- Coração 3- Pulmão 4- Fígado 5- Rim 6- Baço 7- Estômago 8- Intestino 9- Sangue 10- Soro 11- N.I.				
43 Foi coletado material para histopatológico/immunohistoquímico? <input type="checkbox"/>		44 Se sim, laboratório de encaminhamento da amostra			
1- Sim 2- Não 9- N.I.		1-IEC 2-IAL 3-FUNED 4-FIOCRUZ 5-LACEN 6-Outro: _____ 9-N.I.			
45 Tipo de material coletado para histopatológico/immunohistoquímico					
1- Cérebro 2- Coração 3- Pulmão 4- Fígado 5- Rim 6- Baço 7- Outro: _____ 9- N.I.					
Observações	46 Tipo de Acondicionamento do material <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
	1- Nitrogênio líquido		3- Fomal		9- N.I.
	2- Gelo seco		4- Gelox		Outro: _____
OBSERVAÇÕES					
47 Outras informações que forem consideradas relevantes					
_ _ _ _ _ _ _ _ _ _					
Investigador	48 Nome do responsável		49 Data da necropsia		50 Assinatura do responsável
	51 Função		52 Telefone de contato		

ANEXO 5
Ficha de identificação de primatas de vida livre

	UZV/CGDT/DEVIT/SVS Ministério da Saúde	FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE PRIMATAS	Nº 	
Local	1 Município <input style="width: 100%;" type="text"/>		2 UF <input style="width: 100%;" type="text"/>	
	3 Localidade <input style="width: 100%;" type="text"/>		4 Data de captura <input style="width: 100%;" type="text"/>	
	5 Endereço <input style="width: 100%;" type="text"/>		6 Nome/ Telefone de Contato <input style="width: 100%;" type="text"/>	
	7 Geocampo 1 <input style="width: 100%;" type="text"/>		8 Geocampo 2 <input style="width: 100%;" type="text"/>	
	9 Ponto de Referência: <input style="width: 100%;" type="text"/>			
Características do local de captura	CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DE CAPTURA			
	10 Motivo da captura <input type="checkbox"/> 1- Epizootia 2- Área de interesse epidemiológico 3- Invest. casos humanos 4- Projeto: _____ 5- Outro: _____			
	11 Tipo de local: <input type="checkbox"/> 1- CETAS 2- Zoológico 3- Residência 4- Área rural 5- Área urbana 6- Área silvestre 7- Outro _____			
	12 Horário de captura: _____ h _____ min	13 Método de captura: <input type="checkbox"/> 1- Armadilha 2- Dardos 3- Outro _____	14 Apreendido do tráfico? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não	15 Domesticado? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não
	16 Bioma: <input type="checkbox"/> 1- Amazônia 4- Cerrado 2- Mata Atlântica 7- Pampa 3- Caatinga 6- Pantanal	17 Se rural, tipo de atividade: <input type="checkbox"/> 1- Pecuária Atividade principal: _____ 2- Agricultura Atividade principal: _____ 3- Outros: _____	18 Horário de soltura: _____ h _____ min	
	19 Animal procedente de área de captura? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I.		20 Anestésico usado: _____ Se não, de qual Área?: _____ Nome: _____ Dose: _____	
Dados do Animal	IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL			
	21 Gênero: <input type="checkbox"/> 1- Alouatta 2- Ateles 3- Callithrix 4- Cebus 9- N.I. Outro: _____ Espécie: _____			
	22 Sexo: <input type="checkbox"/> 1- Macho 2- Fêmea 3- NI	23 Idade: <input type="checkbox"/> 1- Filhote 2- Juvenil 3- Adulto 4- Senil	24 Peso: _____ Kg	
	25 Biometria Perímetro torácico: _____ cm Perímetro encefálico: _____ cm Comprimento do corpo: _____ cm Comprimento da cauda: _____ cm Mão direita: _____ cm Pé direito: _____ cm Pavilhão auditivo direito: _____ cm		26 Possui microchip? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I. Nº microchip: _____	
			27 Foi microchipado? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I. Nº microchip: _____	
			28 Marcas ou cicatrizes? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I. Local: _____	
29 Faz outra identificação do Animal? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I. Se sim, qual tipo? _____				
Exatidão Clínica	AVALIAÇÃO CLÍNICA DO ANIMAL			
	30 Estado geral do animal: <input type="checkbox"/> 1- Bom 2- Regular 3- Ruim 9- N.I.		31 Temperatura: _____ °C	32 Presença de ectoparasitas: <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não 9- N.I. Sim, qual (s)? _____
	33 Freq. Cardíaca _____ BPM	34 Freq. Respiratória _____ MPM	35 Hidratação: <input type="checkbox"/> 1- Hidratado 2- Desidratado	36 Dentição: 1- Sim Saudável <input type="checkbox"/> 2- Não Quebrado: <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não
	37 Observação Clínica (sist. respiratório, digestório e genito-urinário) <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>			
	38 Sintomas / Sinais Neurológicos: <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não Quais? 9- N.I. <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>			

Material Coletado	39 Material Coletado		Colheita de Amostras		Exame Laboratorial				
	N° de Amostras	Identificação das Amostras	IV	IH	PCR	Parasitológico	Outro		
	Fezes								
Urina									
Sangue									
Soro									
Gota Espessa									
Secreções									
Ectoparasitas									
Pêlos									
Secreção									

IV= Isolamento Viral IH= Inibição de Hemaglutinação PCR= Reação em Cadeia de Polimerase

RESULTADOS LABORATORIAIS

Resultados Laboratoriais	40 Sologia/ IH 1- Reagente 2- Não Reagente <input type="checkbox"/> Alphavirus Qual/Titulação: _____ <input type="checkbox"/> Orthobunyavirus Qual/Titulação: _____ <input type="checkbox"/> Flavivirus Qual/Titulação: _____	41 Sologia/ Neutralização 1- Reagente 2- Não Reagente <input type="checkbox"/> Alphavirus Qual/Titulação: _____ <input type="checkbox"/> Orthobunyavirus Qual/Titulação: _____ <input type="checkbox"/> Flavivirus Qual/Titulação: _____	42 Parasitológico: <input type="checkbox"/> 1- Observado 2- Não Observado Qual? _____ Sangue <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/>
	43 Outros Resultados Laboratoriais: _____ _____ _____		

OBSERVAÇÕES

44 Outras informações:

Investigador	45 Nome do responsável	46 Data da captura	47 Assinatura do responsável
	48 Função	49 Telefone de contato	

50 Foto do Local onde o Animal foi Capturado:

Panorâmica	Local de captura



Technical Report

The obscurance of the greatest sylvatic yellow fever epidemic and the cooperation of the Pan American Health Organization during the COVID-19 pandemic

Carlos Frederico Campelo de Albuquerque e Melo^[1], Pedro Fernando da Costa Vasconcelos^[2], Luiz Carlos Júnior Alcantara^{[3],[4]} and Wildo Navegantes de Araujo^[1]

[1]. Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Brasília, DF, Brasil.

[2]. Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil.

[3]. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[4]. Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Genética, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Abstract

Introduction: Since 2016, Brazil has been in the midst of its largest sylvatic yellow fever epidemic ever, found predominantly outside the Amazon region. Cases originating from Brazil have been reported in France, the Netherlands, Romania, Switzerland, Argentina, and Chile. The epidemic began in the Central-West region of Brazil in 2014, spreading into the Southern region, with significant non-human primate transmission continuing towards Paraguay and Argentina. **Methods:** This report is an integrative review of Pan American Health Organization cooperation during a sylvatic yellow fever epidemic. **Results:** The Pan American Health Organization has played a central role in handling the yellow fever emergency, collaborating with the Ministry of Health and various research groups in supporting interventions of different response areas. The Pan American Health Organization's technical cooperation included: training and workshops to exchange experiences, carrying out technical cooperation in patient management and epidemiological, entomological, laboratory, and epizootic surveillance, organizing the assistance network, and acquiring strategic inputs. The Pan American Health Organization's technical cooperation supported the Ministry of Health's decision to adopt a single-dose vaccine and use fractional doses to support the vaccination needs of more than 39,000,000 people. The coronavirus disease 2019 pandemic contributed to the failure of reaching the yellow fever vaccination goals and made it difficult to integrate the yellow fever vaccine into recommended areas. **Conclusions:** Given the ongoing coronavirus disease 2019 pandemic, it is necessary to strengthen measures for the surveillance, prevention, and control of yellow fever with multilateral cooperation between countries.

Keyword: Yellow Fever. Disease Outbreak. Epidemic. Communicable Disease Control. International Cooperation. Pan American Health Organization.

Brazil is currently experiencing its greatest sylvatic yellow fever (YF) epidemic ever, reaching a record number of cases (2,114 cases) between 2016 and 2018. The epidemic is centered predominantly outside the Amazon region (2,104 cases), and has reached more than 4 times the number of all cases over the previous 20 years. As YF is typically a multimodal epidemic, we consider the period from 2016-2018, after the epidemic began in the Central-West region of

Brazil in 2014 and spread into the Southern region, to be part of the two or more waves marking the peak of an epidemic¹.

This particular epidemic was marked by the persistent transmission of the virus in non-human primates (NHP), even in periods of low seasonality, which has subsequently affected areas previously considered to be without risk, such as the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, and the eastern portions of Bahia and São Paulo. This increase in the territory affected by the virus, along with an associated increase in the recommendation of anti-yellow fever vaccination, has increased vaccine demand by 30,000,000 doses. Currently, vaccination is being expanded to include the whole country. YF transmission has been so intense that there have been reports of cases originating in Brazil documented in France, the Netherlands, Romania, Switzerland, Argentina, and Chile².

Corresponding author: Carlos Frederico Campelo de Albuquerque e Melo.
 e-mail: carloiscampelo@gmail.com

● <https://orcid.org/0000-0003-0581-5535>

Received 2 November 2020

Accepted 16 November 2020

In addition to the known epidemic described above, the Evandro Chagas Institute of the Health Surveillance Secretariat of the Brazilian Ministry of Health detected the YF virus in *Aedes albopictus* mosquitoes captured in the state of Minas Gerais. It is widely known that these insects are capable of bridging the gap between sylvatic and urban transmission, increasing the risk of YF re-urbanization³⁴.

In regards to the overlap of this YF epidemic with the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, the present report aimed to present the strategies adopted by the Pan American Health Organization (PAHO) in order to improve the understanding of various types of international technical cooperation in health care. The present report entails an integrative review of the cooperative actions carried out by PAHO in coping with the YF epidemic from 2016 to 2020.

The Ministry of Health (MoH), in compliance with the International Health Regulations (IHR), notified PAHO of known YF cases in January 2017. PAHO then issued an epidemiologic alert for all American countries, in accordance with the IHR, which has been found to be an effective instrument with which to start response activities in the event of a disease outbreak.

In Brazil, PAHO has played a central role in the technical handling of the current YF emergency, collaborating with the MoH and MoH-partnered research groups in regards to the national response and preparation of other countries within the Americas that may be affected by this YF epidemic. Through the direct participation of their specialized teams *in situ* and providing of supportive interventions in different response areas, PAHO facilitated the dialogue of several health institutions, and contributed to the knowledge regarding YF transmission, as described in the post-event evaluation and control actions of YF in the state of Minas Gerais⁵.

The response to the ongoing YF epidemic has brought together the expertise of scientists from different disciplinary fields, involving clinical, epidemiological, virological, laboratory, and public policy aspects, forming a multidisciplinary and multi-institutional team. It is worth mentioning that the established research capacity in Brazil was decisive in ensuring a fast and accurate response. The participation of the Evandro Chagas Institute and the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), which are federal institutes whose missions are to produce, disseminate, and share knowledge and technology that contributes to bettering the health and the quality of life of the Brazilian population, was very important to the YF response. In addition to generating knowledge, Fiocruz is also responsible for producing immunobiological and diagnostic tests.

Historically, technical cooperation in the fight against YF was begun with the inception of PAHO, which has addressed the disease since its creation in 1902, as the International Sanitary Bureau of the American Republics. The program was institutionalized at the first International Sanitary Convention of the American Republics in 1902, during which the vector-borne transmission of YF, a historically neglected theme, was discussed. PAHO is proud to have achieved the elimination of urban YF with the eradication of *Aedes aegypti* in 1942.

Honoring its mission “to promote equity in health, to combat disease, and to improve the quality of, and lengthen the lives of the peoples of the Americas”, PAHO has spared no efforts to tackle this epidemic, which has been supported by the Global Outbreak Alert and Response Network (GOARN).

PAHO’s technical cooperation occurred in several ways: training and workshops to exchange experiences; carrying out technical cooperation in the areas of patient management and epidemiological, entomological, laboratory, and epizootic disease surveillance; and organization of an assistance network. Equally important was the dissemination of knowledge with support for the creation of distance education courses, the publication of handbooks, the hiring of personnel for laboratory and field epidemiology activities, and the acquisition of strategic items, including dry ice, syringes, software licenses, vaccines, and supplies for molecular and histopathological diagnosis.

PAHO also organized, for the first time on the American continent, a meeting for the Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) strategy, including the World Health Organization (WHO), United Nations International Children’s Emergency Fund (UNICEF), and Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI), with more than 130 partners. PAHO’s technical cooperation supported the decision of the MoH to adopt a single-dose vaccine, which had been recommended by the organization since 2013, and the use of fractional doses to support the vaccination needs of more than 39,000,000 people. The 7,648,772 fractional doses used provided savings of more than 6,000,000 doses. Figure 1 shows a timeline of the primary milestones of cooperation in facing YF.

Professionals hired by PAHO, who then transferred to Brazilian National Laboratories, had significant findings of the YF virus in monkeys of the Callitrichidae family. Managerial support for decisions to expand the recommended vaccination area, adjust the vaccination schedule (adoption of a single dose), and adopt a campaign for fractional doses are also among the cooperative activities carried out by PAHO in Brazil during the current YF epidemic^{6,7}.

It is worth emphasizing PAHO’s participation in the genomic surveillance of YF, a decisive measure to direct Brazil’s response and reaction to national and international concerns about transmission dynamics, including the type of transmission cycle (sylvatic or urban), virus travel speed and origin, and level of introduction of the virus (initial, single, or reintroduction), etc. In this regard, it is also necessary to mention PAHO’s support of the studies that culminated in the publications “Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential” and “Yellow fever virus reemergence and spread in Southeast Brazil, 2016–2019”^{8,9}.

The present technical report is necessary due to the weakening role of the World Health Organization (WHO) in the coordination of efforts against COVID-19, and the non-compliance of various nations to the IHR. These factors, along with the reduction of funding to WHO by powerful nations, have diminished both the spirit of solidarity between nations and the multilateral approach needed to respond adequately to the pandemic¹⁰.

The ongoing YF epidemic in Brazil continues to show a significant rate of transmission in the Central–West and Southern regions of Brazil, continuing towards Paraguay and Argentina. The

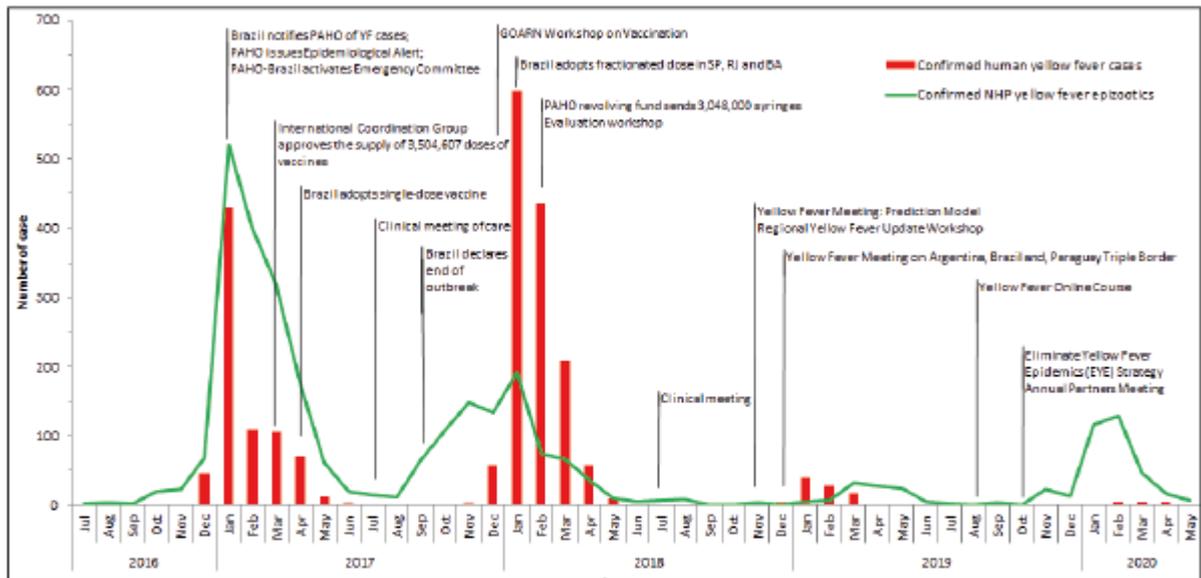


FIGURE 1: Confirmed yellow fever cases in humans and non-human primates by month, and timeline of PAHO cooperation in responding to the 2016-2019 sylvatic yellow fever epidemic in Brazil.

COVID-19 pandemic has contributed to the failure of Brazil to meet the YF vaccination coverage goals, and has made it difficult to implement the YF vaccine in recommended areas. During the ongoing COVID-19 pandemic, it is necessary to strengthen measures for the surveillance, prevention, and control of YF, and multilateral cooperation between countries.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the PAHO and MoH professionals involved in responding to the YF epidemic.

AUTHORS' CONTRIBUTION

All authors contributed to the conceptualization, writing and revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Febre Amarela no monitoramento 2019/2020. Bol. Epidemiol 51, 12–28 (2020).
2. Organização Pan-americana da Saúde. Actualización Epidemiológica Febre amarilla 20 de marzo 2018. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50496/EpiUpdate20March2018_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Accessed July 30, 2020.
3. Instituto Evandro Chagas (IEC). Instituto Evandro Chagas detecta virus da Febre Amarela em mosquito Aedes albopictus no Brasil [Internet]. IEC; 2018 [updated 2020 October 26; cited 2020 Nov 2]. Available from: <https://www.iec.gov.br/descoberta/>
4. Vasconcelos PFC. Febre amarela. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(2):275-93.
5. Organização Pan-americana da Saúde (OPAS). Brasil anuncia

fracionamento de doses de vacina contra febre amarela em três estados [Internet]. OPAS; 2018. [updated 2020 October 24; cited 2020 Nov 2] Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5575:brasil-anuncia-fracionamento-de-doses-de-vacina-contra-febre-amarela-em-tres-estados&Itemid=820

6. Organização Pan-americana da Saúde (OPAS). OPAS/OMS colabora com governo brasileiro e Espírito Santo na resposta ao surto de febre amarela [Internet]. OPAS; 2017 [updated 2020 October 27; cited 2020 Nov 2]. Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5389:opas-oms-colabora-com-governo-brasileiro-e-espirito-santo-na-resposta-ao-surto-de-febre-amarela-2&Itemid=812
7. Ministério da Saúde. Informe 27 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil-2017/2018. Available from: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>. Accessed July 30, 2020.
8. Faria N. R., Kraemer MUG, Hill SC, Jesus JG, Aguiar RS, Jani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. Science. 2018;361:894–99.
9. Giovanetti M, Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. J. Virol. 2020;94:1623–42.
10. Conselho Nacional de Saúde (CNS), ACT Promoção da Saúde, Associação Brasileira de Enfermagem, Associação Brasileira de Ensino em Fisioterapia, Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, Associação Brasileira de Nutrição, et al. Carta aberta à sociedade brasileira, ao Congresso Nacional, ao CONASS e ao CONASEMS sobre a relevância da Organização Pan-Americana de Saúde para o SUS [Internet]. CNS; 2020. [updated 2020 July 27; cited 2020 Nov 2]. Available from: <http://www.conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/1268-o-brasil-precisa-da-opas-cns-adere-a-carta-em-defesa-da-organizacao-pan-americana-da-saude>.



Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019

Marta Giovanetti,^{a,b} Marcos Cesar Lima de Mendonça,^a Vagner Fonseca,^{b,c} Maria Angélica Mares-Guia,^a Allison Fabri,^a Joilson Xavier,^b Jaqueline Goes de Jesus,^d Tiago Gräf,^d Cintia Damasceno dos Santos Rodrigues,^a Carolina Cardoso dos Santos,^a Simone Alves Sampaio,^a Flavia Lowen Levy Chalhoub,^a Fernanda de Bruycker Nogueira,^a Julien Theze,^a Alessandro Pecego Martins Romano,^f Daniel Garkauskas Ramos,^f Andre Luiz de Abreu,^g Wanderson Kleber Oliveira,^h Rodrigo Fabiano do Carmo Said,ⁱ Carlos F. Campelo de Albuquerque,ⁱ Tulio de Oliveira,^c Carlos Augusto Fernandes,^j Shirlei Ferreira Aguiar,^j Alexandre Chieppe,^k Patrícia Carvalho Sequeira,^a Nuno Rodrigues Faria,^a Rivaldo Venâncio Cunha,^{l,m} Luiz Carlos Junior Alcantara,^{a,b} Ana Maria Bispo de Filippis^a

^aLaboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratório de Genética Celular e Molecular, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^cKwaZulu-Natal Research Innovation and Sequencing Platform (KRISP), College of Health Sciences, University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa

^dInstituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador, Bahia, Brazil

^eDepartment of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

^fCoordenação Geral de Vigilância de Arboviroses (CGARB), Ministério da Saúde, (CGLAB/SVS-MS), Brasília, Brazil

^gCoordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, (CGLAB/SVS-MS), Brasília, Brazil

^hSecretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS-MS), Brasília, Brazil

ⁱOrganização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, Brasília, Brazil

^jLaboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels (LACEN-RJ), Rio de Janeiro, Brazil

^kSuperintendência de Vigilância do Estado, Rio de Janeiro, Brazil

^lFundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

^mUniversidade Federal do Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina, Campo Grande, Brazil

Marta Giovanetti and Marcos Cesar Lima de Mendonça contributed equally to this article.

ABSTRACT The recent reemergence of yellow fever virus (YFV) in Brazil has raised serious concerns due to the rapid dissemination of the virus in the southeastern region. To better understand YFV genetic diversity and dynamics during the recent outbreak in southeastern Brazil, we generated 18 complete and nearly complete genomes from the peak of the epidemic curve from nonhuman primates (NHPs) and human infected cases across the Espírito Santo and Rio de Janeiro states. Genomic sequencing of 18 YFV genomes revealed the estimated timing, source, and likely routes of yellow fever virus transmission and dispersion during one of the largest outbreaks ever registered in Brazil. We showed that during the recent epidemic, YFV was reintroduced from Minas Gerais to the Espírito Santo and Rio de Janeiro states multiple times between 2016 and 2019. The analysis of data from portable sequencing could identify the corridor of spread of YFV. These findings reinforce the idea that continued genomic surveillance strategies can provide information on virus genetic diversity and transmission dynamics that might assist in understanding arbovirus epidemics.

IMPORTANCE Arbovirus infections in Brazil, including yellow fever, dengue, zika, and chikungunya, result in considerable morbidity and mortality and are pressing public health concerns. However, our understanding of these outbreaks is hampered by the limited availability of genomic data. In this study, we investigated the genetic diversity and spatial distribution of YFV during the current outbreak by analyzing genomic data from areas in southeastern Brazil not covered by other previous studies. To gain insights into the routes of YFV introduction and dispersion, we tracked the virus by sequencing YFV genomes sampled from nonhuman primates and in-

Citation Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, de Jesus JG, Gräf T, dos Santos Rodrigues CD, dos Santos CC, Sampaio SA, Chalhoub FL, de Bruycker Nogueira F, Theze J, Romano APM, Ramos DG, de Abreu AL, Oliveira WK, do Carmo Said RF, de Albuquerque CFC, de Oliveira T, Fernandes CA, Aguiar SF, Chieppe A, Sequeira PC, Faria NR, Cunha RV, Alcantara LJC, de Filippis AMR. 2020. Yellow fever virus reemergence and spread in Southeast Brazil, 2016–2019. *J Virol* 94:e01623-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01623-19>

Editor Julie K. Pfeiffer, University of Texas Southwestern Medical Center

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Marta Giovanetti, giovanetti.marta@gmail.com.

Received 20 September 2019

Accepted 1 October 2019

Accepted manuscript posted online 9

October 2019

Published 12 December 2019

fecting patients from the southeastern region. Our study provides an understanding of how YFV initiates transmission in new Brazilian regions and illustrates that genomics in the field can augment traditional approaches to infectious disease surveillance and control.

KEYWORDS yellow fever, outbreak, Southeast Brazil, genomic surveillance, outbreak response

Yellow fever (YF) is a vector-borne disease that is endemic in tropical areas of Africa and South America (1). The aetiologic agent is the yellow fever virus (YFV), a single-stranded positive-sense RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family (2). YFV diversity can be classified into four distinct genotypes, which have been named based on their geographical distribution, as follows: East African, West African, South American I, and South American II genotypes (3–6).

In the Americas, YFV transmission can occur via two main epidemiological transmission cycles, the sylvatic (or jungle) and the urban (domestic) cycles. In the sylvatic cycle, nonhuman primates (NHPs) are infected through the bite of mosquito vectors such as *Haemagogus* spp. and *Sabethes* spp. (7, 8). However, in the urban cycle, humans can be infected by *Aedes* sp. mosquito bites (9). YFV infection in humans shows a wide spectrum of disease severity, including asymptomatic infection; mild illness with dengue-like symptoms, including fever, nausea, vomiting, and fatigue; and disease, including fever with jaundice or hemorrhage and death (10).

While eradication is not feasible due to the wildlife reservoir system, large-scale vaccination coverage provides considerable protection against the reurbanization of YFV transmission (11). However, despite the availability of effective vaccines, YF remains an important public health issue in Africa and South America. In late 2016, a severe reemergence of the YFV epidemic occurred in southeastern Brazil. The epidemic has evolved to become the largest observed in the country in decades, reaching areas close to the Atlantic rain forest (11, 12). The YFV 2016 to 2017 epidemic in Brazil accounted for 1,412 epizootics, 777 YF human confirmed cases, most of which were in Southeast Brazil (Minas Gerais, $n = 465$; Sao Paulo, $n = 22$; Rio de Janeiro, $n = 25$; Espirito Santo, $n = 252$ confirmed cases), and 261 human deaths (13). Following this epidemic, new cases were reported between 2017 and 2018, and in that period 864 epizootics, 1,376 YF human confirmed cases, and 483 human deaths were registered, with the southern states among the most affected by the YFV epidemic (Minas Gerais, $n = 532$; Sao Paulo, $n = 377$; Rio de Janeiro, $n = 186$; Espirito Santo, $n = 6$ confirmed cases) (14). The epidemic persisted in 2018 and 2019 and accounted for 1,883 NHP notified cases ($n = 20$ confirmed NHP cases) and 12 human confirmed cases, including 5 human deaths from the state of São Paulo. Most of the confirmed epizootic cases were registered in the southeastern states (95%) (São Paulo, $n = 10$; Rio de Janeiro, $n = 8$; and Minas Gerais, $n = 1$) (13–15).

Although there is currently no evidence that urban transmission has occurred, the outbreak affected areas highly infested by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* where yellow fever vaccination was recently introduced in a routine immunization program. This raises concern that, for the first time in decades, there might be a high risk of YFV urban transmission in Brazil (16). New surveillance and analytical approaches are therefore needed to monitor this threat.

Even so, there is limited information from genomic surveillance studies about the genomic epidemiology and the dissemination dynamics of 2016 to 2019 YFV circulating in Southeast Brazil. Previous studies have shown the spatial and evolutionary dynamics of the current YFV outbreak in different southeastern states (11) and shed light regarding the possible cocirculation of distinct YFV lineages (17). Nevertheless, there is still limited information about the genomic epidemiology of YFV circulating in the states of Espirito Santo and Rio de Janeiro from genomic surveillance studies, and this impairs our understanding of the virus reintroduction, establishment, and dissemination in those regions. Thus, to better understand the reemergence of the recent YFV

TABLE 1 Epidemiological data for the sequenced samples^a

ID	C _T value	Sample type	Host	Species	State	Municipality	Collection date (day/month/year)	Age	Sex	Residence
RJ182	8.2	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	RJ	São Sebastião do Alto	09/03/2017	NA	M	
RJ193	10.2	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	RJ	São Sebastião do Alto	27/03/2017	1	M	
RJ141	22.4	Serum	Human		ES	Ibatiba	24/01/2017	16	M	Rural
RJ183	11.2	Serum	Human		RJ	São Sebastião do Alto	12/03/2017	25	M	Rural
RJ194	6.5	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	RJ	São Sebastião do Alto	27/03/2017	15	F	
RJ147	21.9	Whole blood	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	ES	Domingos Martins	31/01/2017	NA	NA	
RJ173	15	Whole blood	NHP	<i>Cebus</i> sp.	ES	Itarana	09/02/2017	NA	NA	
RJ184	14.4	Liver	Human		ES	Cariacica	13/03/2017	65	M	Rural
RJ213	8.1	Liver	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Valença	22/01/2018	5	F	
RJ186	10.9	Liver	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	ES	Guarapari	06/03/2017	NA	NA	
RJ177	11.5	Serum	Human		ES	Brejetuba	16/02/2017	46	M	Urban
RJ188	9.9	Whole blood	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	ES	Cariacica	08/03/2017	NA	NA	
RJ201	13.4	Liver	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Nova Iguaçu	28/11/2017	2	F	
RJ219	11.2	Kidney	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Angra dos Reis	05/02/2018	NA	NA	
RJ189	13.7	Whole blood	NHP	<i>Alouatta</i> sp.	ES	Serra	20/03/2017	NA	F	
RJ216	7.2	Liver	NHP	<i>Callithrix</i> sp.	RJ	Duas Barras	25/01/2018	10	F	
LABFLA09	22.1	Liver	NHP	<i>Leontopithecus Rosalia</i>	RJ	Silva Jardim	24/04/2018	NA	NA	
LABFLA10	11.76	Liver	NHP	<i>Leontopithecus Rosalia</i>	RJ	Silva Jardim	24/04/2018	NA	NA	

^aID, study identifier; C_T, RT-qPCR quantification cycle threshold value; RJ, Rio de Janeiro; ES, Espírito Santo; Municipality, Municipality of residence; F, female; M, male; NA, not available.

epidemic in those regions, we analyzed a larger and updated data set of recently released data of the YFV 2016 to 2019 epidemic in Brazil, including 18 newly generated complete genomes from areas not covered by other previous studies from human and NHPs from the southeast states of Espírito Santo and Rio de Janeiro.

(This article was submitted to an online preprint archive [18].)

RESULTS

Molecular diagnostics and genome sequencing from clinical samples. Liver, spleen, kidney, and blood samples from 14 NHPs and liver and serum samples from 4 human infected cases collected from areas not covered by other previous studies in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Southeast Brazil, between January 2017 and April 2018, were tested for YFV RNA using the reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay (19, 20) at the Flavivirus Laboratory at FIOCRUZ Rio de Janeiro (LABFLA/FIOCRUZ).

Most confirmed cases in NHPs were from animals of the *Alouatta* genus (42.9%; 6 of 14), followed by *Callithrix* (35.7%; 5 of 14), *Sapajus* (7.1%; 1 of 14), and *Leontopithecus rosalia* (14.3%; 2 of 14). PCR cycle threshold (C_T) values were on average 12.23 (range, 7.2 to 22.4) (Table 1).

The median age of human patients was 38 years (range, 16 to 65 years). A total of 75% of the affected subjects lived in rural areas (Table 1). Only one subject lived in an urban area, with a history of travel to rural areas. To investigate the source and transmission of YFV and the genetic diversity of the virus circulating in humans and NHPs across the Rio de Janeiro and Espírito Santo states, we used the MiniON handheld nanopore sequencer to generate 18 complete and near complete genomic sequences (average coverage = 89.9%; Table 2) using a previously described MiniON sequencing protocol (11, 21) that allowed rapid data generation through fast sample preparation and library construction (1 day) as an interesting approach to get rapid critical information (such as lineage identification and pathogen transmission dynamics) useful for surveillance services and decision makers.

YF samples sequenced in this study were geographically widespread across 6 municipalities of Rio de Janeiro and 7 municipalities of Espírito Santo (Fig. 1A).

Fig. 1B shows the number of YFV confirmed cases in the Espírito Santo and Rio de Janeiro states. Epidemiological data revealed two distinct YFV epidemic waves. The first epidemic wave (wave 1) is represented by the YFV cases mainly registered in the state of Espírito Santo during the first semester of 2017 (January to April; $n = 252$ cases),

TABLE 2 Sequencing statistics for the 18 new obtained sequences

Study identifier	NCBI accession no.	No. of mapped reads	Avg depth coverage	No. of bases covered >10x	No. of bases covered >25x	Reference covered (%)
RJ182	MK882607	21,104	961.34	10,220	10,220	99.31
RJ193	MK882613	2,953	133.99	10,215	9,697	95.95
RJ141	MK882601	11,776	523.89	10,175	9,955	96.17
RJ183	MK882608	1,453	67.88	9,934	8,599	82.52
RJ194	MK882615	1,146	55.27	9,381	7,964	79.84
RJ147	MK882602	3,319	148.16	8,461	7,651	71.19
RJ173	MK882599	1,361	63.57	9,017	7,628	74.68
RJ184	MK882609	1,241	57.04	9,480	8,109	78.23
RJ213	MK882618	2,520	116.01	10,206	9,674	93.01
RJ186	MK882610	4,007	190.77	9,460	9,445	90.36
RJ177	MK882604	22,538	1,057.4	10,227	10,219	99.31
RJ188	MK882611	74,369	3,227.15	10,237	10,231	99.31
RJ201	MK882617	8,679	399.91	9,490	9,454	90.34
RJ219	MK882621	8,894	405.58	10,205	9,957	96.2
RJ189	MK882612	4,840	219.19	9,695	9,146	89.4
RJ216	MK882619	6,807	313.58	10,220	9,709	93.1
LABFLA09	MK882600	312,871	4,637.05	10,210	9,975	89.97
LABFLA10	MK882603	470,582	5,028.42	9,693	9,871	99.35

although some sporadic cases were reported in the following year (Fig. 1B). The second wave (wave 2) is represented by YFV cases registered in the state of Rio de Janeiro during the first semester of 2018 (February to May; $n = 220$ cases) (Fig. 1B). Although the majority of cases in Rio de Janeiro occurred between February and March 2018, there was also a reemergence of YFV in that state detected around March 2017 during epidemic wave 1 that mainly affected the state of Espírito Santo.

Genetic history of YFV in southeastern Brazil. To investigate the phylogenetic relationship of YFV strains circulating in the southeastern states of Espírito Santo and Rio de Janeiro, we estimated a maximum likelihood (ML) phylogenetic tree for a data set of 181 reference sequences comprising the four YFV lineages. Our ML phylogeny revealed that, as suspected, the newly generated YFV sequences belong to the South American I (SA1) lineage with high statistical support (bootstrap = 100%), clustering with other Brazilian isolates from the 2016 to 2019 epidemic (Fig. 2).

Subsequently, to investigate the dynamics of the YFV epidemic within the Southeast Region, genetic analyses were conducted on a second data set (data set 2; $n = 137$), including recently published sequences from the YFV 2016 to 2019 epidemic in Brazil,

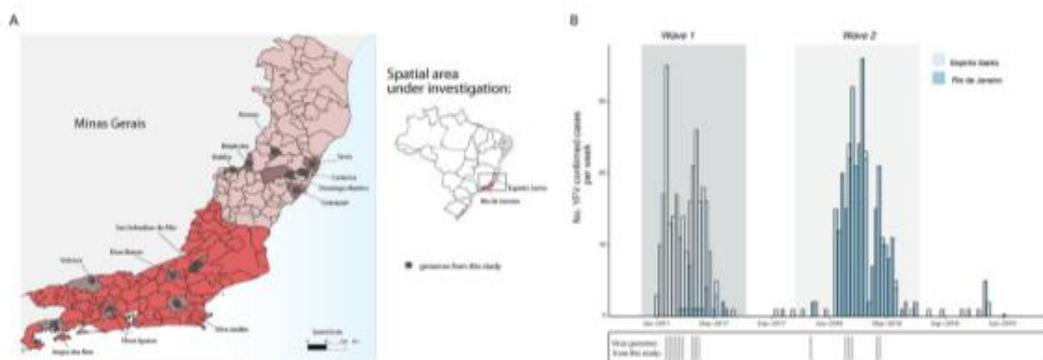


FIG 1 Spatial and temporal distribution of YF cases from the Espírito Santo and Rio de Janeiro states during 2017 and 2019. (A) Map of the states of Espírito Santo (ES) and Rio de Janeiro (RJ), located in the southeastern region of Brazil and its municipalities. Circles indicate where samples from this study were collected. (B) Time series of human (H) and nonhuman primate YFV cases in ES and RJ states confirmed by serology, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR), or virus isolation. Below, the dates of sample collection of the virus genomes generated in this study are shown in gray bars.

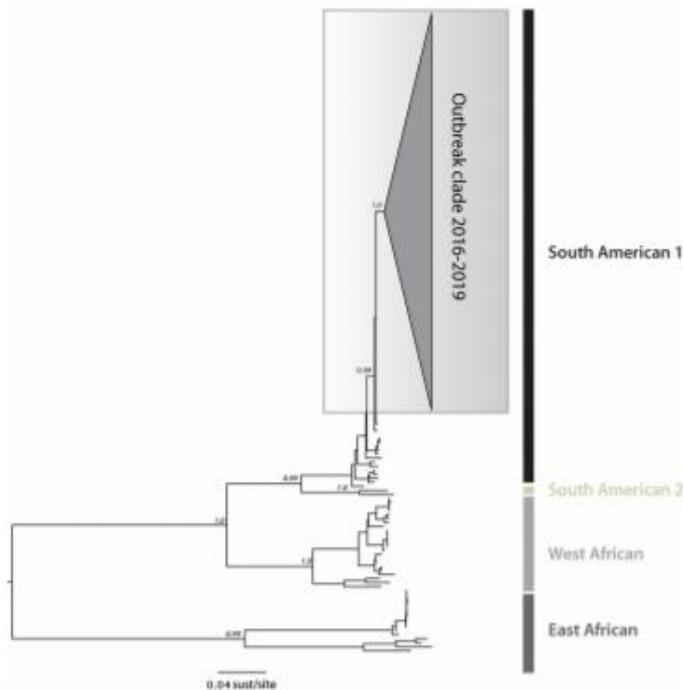


FIG 2 Molecular phylogenetics of the Brazilian YFV epidemic. Maximum likelihood phylogeny of complete YFV genomes showing the outbreak clade (gray triangle) within the South American 1 (SA1) genotype. The scale bar is in units of substitutions per site (sust/site).

belonging to the SA1 lineage. The time scale of our phylogenetic estimates was consistent with recent studies (17, 22, 23) and confirmed the presence of two distinct lineages circulating in the current YFV epidemic, named hereafter as SA1 lineage 1 and SA1 lineage 2 (Fig. 3). SA1 lineage 1 comprises sequences from the northern and eastern regions of the Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, and Rio de Janeiro states, and the time of the most recent common ancestor (TMRCA) of this lineage was dated back to September 2016 (95% Bayesian credible interval [BCI]; July to November 2016). The SA1 lineage 2 comprises sequences from the southern municipalities of Minas Gerais and sequences from the southeastern state of Sao Paulo, and the TMRCA of this lineage was dated back to around July 2016 (95% BCI; June to December 2016) (Fig. 3). Our time-scaled phylogeny showed that the sequences generated in this study clustered together with high support (posterior probability [pp] = 90%) within SA1 lineage 1 (Fig. 3).

In order to understand the transmission and the spatiotemporal evolution of SA1 lineage 1, we analyzed a subset of 80 (data set 3) sequences representing all of the available sequences from this lineage (Fig. 4). We performed a regression of genetic divergence from root to tip against sampling dates that confirmed sufficient temporal signal ($r^2 = 0.70$) in this data set. A time-scaled phylogenetic analysis using a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) framework (24) was then performed to investigate the time of introduction of YFV into the Espírito Santo and Rio de Janeiro states (Fig. 5A). Figure 5A shows a zoom of our Bayesian time-scaled phylogeny highlighting SA1 lineage 1 comprising the 2017 to 2019 YFV strains from the Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, and Rio de Janeiro states. Our analysis showed that samples from Espírito Santo

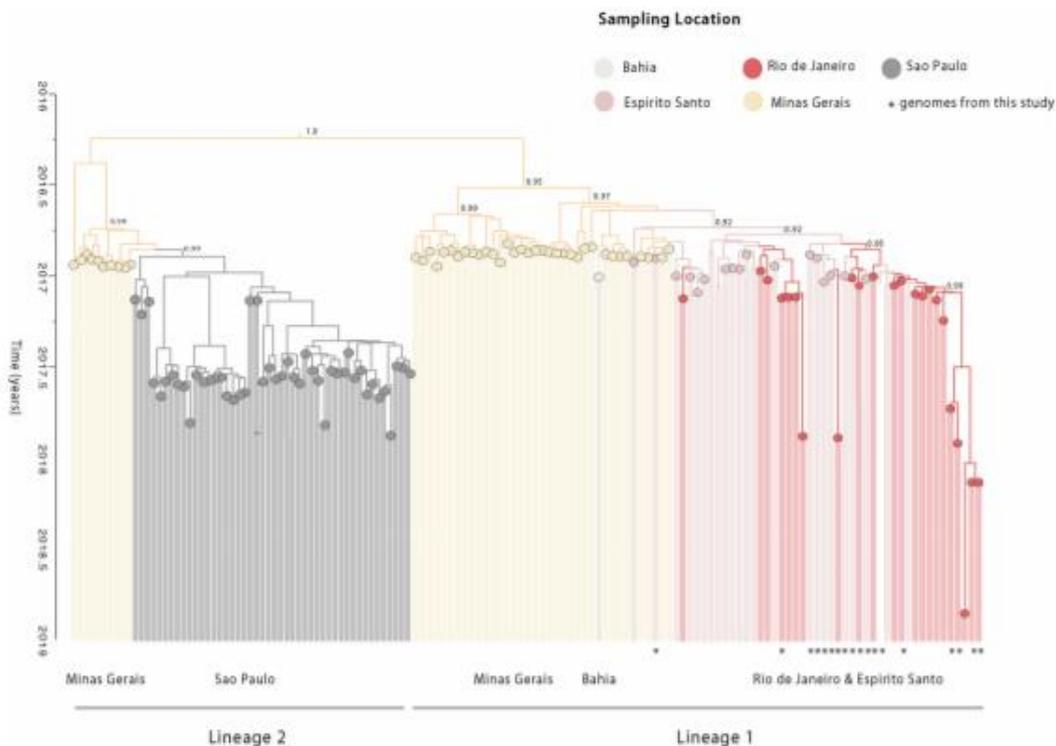


FIG 3 Time-scaled phylogenetic tree of the current YF epidemic in Brazil. Molecular clock phylogeny obtained by combining the 18 new YFV complete genomes generated here (starred tips) plus publicly available data ($n = 137$) of the YFV 2016 to 2019 epidemic in Brazil (11, 12, 17, 22, 23). Numbers in nodes represent clade posterior probability of >0.90 . Branch colors represent different sampling locations.

were intermixed with sequences from Rio de Janeiro. This suggests that the YFV epidemic in Espirito Santo and Rio de Janeiro was not caused by a single introduction event, as observed in Sao Paulo (17, 22), but resulted from multiple introductions over time.

We next used a continuous diffusion model to investigate how SA1 lineage 1 has been spreading over space and time. We found evidence that YFV disseminated through southeastern Brazilian states using two distinct paths with an average dispersal rate of 0.12 km/day (95% high posterior density [HPD], 0.09 to 0.14 km/day). From the northern region of Minas Gerais state, YFV spread to the south region of Bahia state around January 2017 (95% BCI, December 2016 to February 2017) (Fig. 5), and from the eastern region of Minas Gerais state, YFV moved toward Espirito Santo state ($pp = 0.99$) with introductions estimated around January 2017 (95% BCI, November 2016 to January 2017) (Fig. 5A and B). Since its introduction in the Espirito Santo state, the virus has spread through the neighboring state (Fig. 5). Our analyses revealed that YFV was likely introduced in Rio de Janeiro state several times between January (95% BCI, December 2016 to February 2017) and March 2017 (February 2017 to May 2017), spreading southward from the border with Espirito Santo state and reaching Angra dos Reis municipality, which is located in the southern region of Rio de Janeiro. Our data further suggest that after its first introduction in Rio de Janeiro, the virus persisted until 2019 as indicated by the isolate [MKS33792](#) sampled in the municipality of Casimiro de Abreu in January 2019 (12) (Fig. 5A), reinforcing the need for maintaining continuous surveillance and high vaccination coverage in the southeastern region.

Sampling Location

- Minas Gerais
- Bahia
- Espírito Santo
- Rio de Janeiro

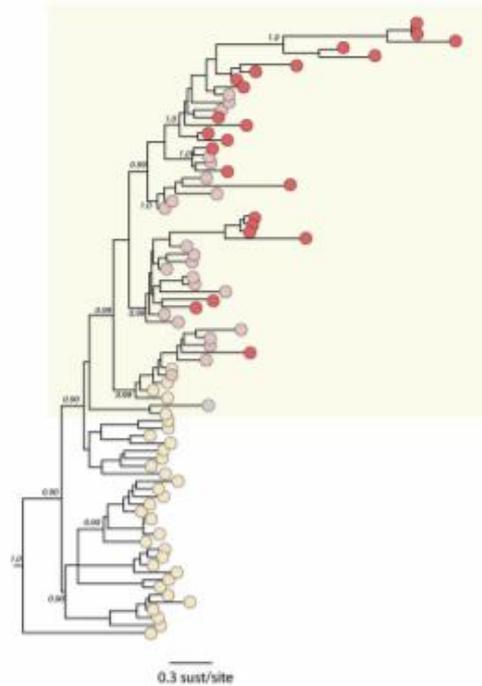


FIG 4 Molecular clock phylogeny including the clade comprising the new isolates plus all the YFV strains from the 2017 to 2019 outbreak belonging to the SA1 lineage 1 clade. Numbers along branches represent clade posterior probability of >0.90. Colors represent different locations.

DISCUSSION

In this study, we generated and analyzed 18 new YFV complete and nearly complete genomic sequences from samples from humans and nonhuman primates collected in several municipalities not covered by other previous studies in the Espírito Santo and Rio de Janeiro states in 2017 and 2018.

Although previous studies have already shown the spatial and evolutionary dynamics of the current YFV outbreak in Brazil (11, 12, 17, 22), the shortage of genomic data from the Espírito Santo and Rio de Janeiro states hampered the ability to shed light on the reemergence and establishment of YFV transmission in those regions. Trying to determine in a large scale the corridor of spread of YFV and the geographic hot spots is key to predicting and preventing other possible spillover events. The generated genomic data provide a more detailed understanding of the introduction and progression of YFV SA1 lineage 1 and reveal the timing, source, and likely routes of yellow fever virus transmission and dispersion during the largest outbreak in Brazil in decades.

According to the Ministry of Health epidemiological bulletin, YFV reemergence in the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro was confirmed in January and February of 2017, respectively (13–15).

Our estimates indicated that YFV strains from the epidemic first emerged in the state of Espírito Santo from Minas Gerais around January 2017 (95% BC), November 2016 to January 2017), which is consistent with epidemiological data (13–15). From the state of

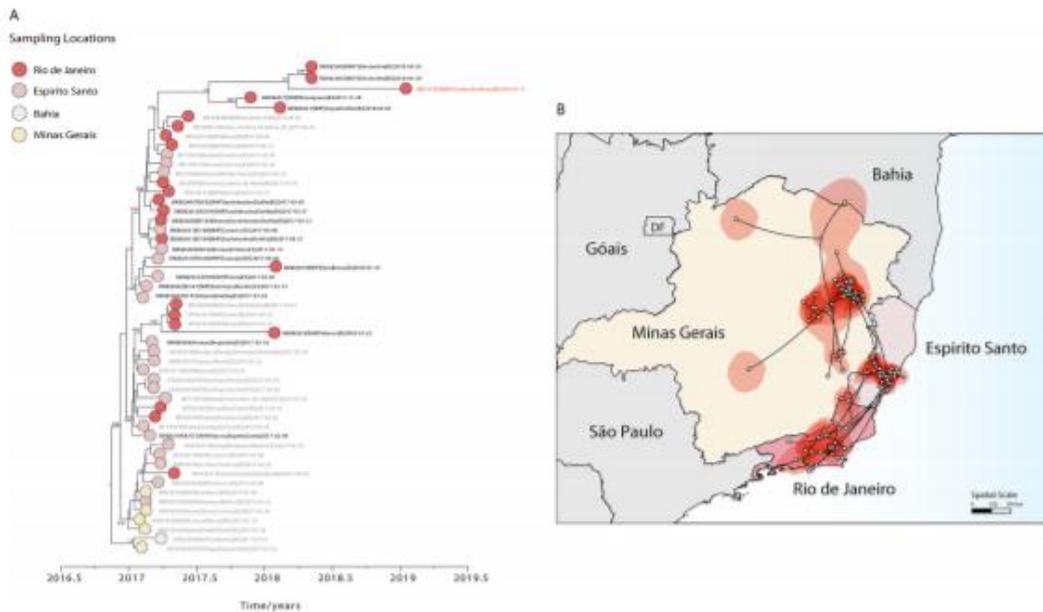


FIG 5 Spatiotemporal dynamics of YFV SA1 lineage 1. (A) Molecular clock phylogeny including the clade comprising the 2017 to 2019 YFV strains from Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, and Rio de Janeiro states belonging to SA1 lineage 1. Numbers along branches represent clade posterior probability of >0.90 . YFV isolates from Casimiro de Abreu, sampled in January 2019, are highlighted in red. Colors represent different locations. (B) Reconstructed spatiotemporal continuous diffusion of the YFV SA1 lineage 1 outbreak clade. Phylogenetic branches are mapped in space according to the location of phylogenetic nodes (circles). Lines show the cross-state movement of the virus from Minas Gerais followed by movement to the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro. Shaded regions show 95% credible regions of internal nodes.

Espírito Santo, YFV spread southward to the great metropolitan area of Rio de Janeiro state. Moreover, our data indicated that the circulation of YFV in Rio de Janeiro may have resulted from multiple and independent introduction events from Espírito Santo state, highlighting a complex dispersion dynamic of the current YFV outbreak in Brazil, which occurred between January (95% BC), December 2016 to February 2017) and March 2017 (February 2017 to May 2017). Our data further suggest that after its first introduction in Rio de Janeiro, the virus persisted until 2019 as indicated by the isolate MKS33792 sampled in the municipality of Casimiro de Abreu in January 2019 (12). This estimation suggests that YFV might have persisted in Rio de Janeiro state for approximately 24 months. This suggests that Rio de Janeiro state possibly possesses the ecological conditions to maintain YFV outside the period of transmission (December to May) (12). Ultimately, given the abundance of sylvatic competent vectors (12) and nonhuman primates (22, 23), these data could indicate that there is some potential for the establishment of an enzootic transmission cycle of yellow fever in Mata Atlântica.

Epidemiological data also indicated two distinct YFV epidemic waves (13, 14). The first epidemic wave is represented by the YFV cases mainly registered in the Minas Gerais and Espírito Santo states during the first semester of 2017, while the second wave is represented by the YFV cases registered in Rio de Janeiro state during the first semester of 2018. Transmission of YFV in areas with susceptible NHP species typically occurs in time periods characterized by environmental conditions suitable to support higher mosquito abundance (12, 25).

As previously suggested (17), we found evidence regarding the circulation of two distinct YFV lineages that might have been spread at distinct evolutionary and diffusion rates. Using YFV genetic data, we estimate that YFV SA1 lineage 1 spread at a rate of

0.12 km/day (95% HPD, 0.09 to 0.14 km/day), which is slightly lower than previous estimates (11, 17). This might be due to the larger data set analyzed in this study, which might explain differences in the rate of YFV spread among different areas as well as different lineages.

These findings reinforce the idea that continued genomic surveillance strategies are needed to assist in the monitoring and understanding of arbovirus epidemics, which might help to attenuate the public health impacts of infectious diseases. In the present research article, we aimed to provide genomic information and reinforce the idea of the use of epidemiological and genomic data generated by a portable, easy to set up sequencing system as an approach to get rapid critical information (such as lineage identification and pathogen transmission dynamics) that could be used by surveillance services and decision makers.

In this study, we also demonstrate that by analyzing heterochronous data sets with samples collected in different time points and/or locations, phylodynamics becomes a powerful tool to prevent and identify viral lineage movement and to describe trends in epidemic spread (11, 26, 27).

Continued surveillance in humans and nonhuman primates (NHP) in nonepidemic periods in the Southeast Region will be important in order to quantify the risk of new outbreaks and the establishment of new YFV transmission cycles in the region. In conclusion, our study shows that genomic data generated by portable sequencing technology can be employed to assist public health services in monitoring and understanding the diversity of circulating mosquito-borne viruses.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Human and nonhuman primate samples were collected under the guidelines of a national strategy of YF surveillance for molecular diagnostics by the Flavivirus Laboratory (LABFLA) at Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) in Rio de Janeiro, Brazil, which is a Brazilian Ministry of Health Regional Reference Laboratory for arboviruses. The majority of samples were linked to a digital record that collated epidemiological and clinical data, such as date of sample collection, municipality of residence, neighborhood of residence, demographic characteristics (age and sex), and date of onset of clinical symptoms.

Ethical statement. The project was supported by the Pan American World Health Organization (PAHO) and the Brazilian Ministry of Health (MoH) as part of the arboviral genomic surveillance efforts within the terms of Resolution 510/2016 of CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Ministério da Saúde; National Ethical Committee for Research, Ministry of Health). The diagnostic of YFV infection at LABFLA was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Institute (CAAE90249218.6.1001.54248).

RT-qPCR. Total RNA was extracted from tissue and serum samples using a MagMAX pathogen RNA/DNA kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Viral RNA was detected using two previously published RT-qPCR techniques (19, 20).

cDNA synthesis and whole-genome nanopore sequencing. Sequencing was attempted on the 18 selected RT-PCR-positive samples regardless of C_T value as previously described (11, 21, 27). All positive samples were submitted to a cDNA synthesis protocol (11, 21) using a ProtoScript II first strand cDNA synthesis kit. Then, a multiplex tiling PCR was attempted using the previously published YFV primer scheme and 30 cycles of PCR using Q5 high-fidelity DNA polymerase (NEB) as previously described (21). Amplicons were purified using 1× AMPure XP beads (Beckman Coulter), and cleaned-up PCR product concentrations were measured using a Qubit double-stranded DNA (dsDNA) high-sensitivity (HS) assay kit on a Qubit 3.0 fluorimeter (Thermo Fisher). DNA library preparation was performed using the Ligation sequencing kit (Oxford Nanopore Technologies) and the Native barcoding kit (NBD103; Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). A sequencing library was generated from the barcoded products using the genomic DNA sequencing kit SQK-MAP007/SQK-LSK208 (Oxford Nanopore Technologies). The sequencing library was loaded onto a R9.4 flow cell (Oxford Nanopore Technologies).

Generation of consensus sequences. Consensus sequences for each barcoded sample were generated following a previously published approach (21). Briefly, raw files were basecalled using Albacore, demultiplexed and trimmed using Porechop, and then mapped with *bwa* to a reference genome (GenBank accession number JF912190). Nanopolish variant calling was applied to the assembly to detect single-nucleotide variants to the reference genome. Consensus sequences were generated; nonoverlapping primer binding sites and sites for which coverage was <20× were replaced with ambiguity code N. Sequencing statistics can be found in Table 1.

Collation of YFV complete genome data sets. Genotyping was first conducted using the phylogenetic yellow fever typing tool available at <http://www.krisp.org.za/tools.php>. The genome sequences generated here were combined with a data set comprising previously published genomes from the 2016 to 2019 YFV epidemic in Brazil (11, 12, 17, 22, 23). Two complete or nearly complete YFV genome data sets were generated. Data set 1 ($n = 199$) comprised the data reported in this study ($n = 18$) plus ($n = 181$) complete or almost complete YFV genomic sequences (>10,000 bp) retrieved from NCBI in

June 2019 and covering all four existing genotypes. Subsequently, to investigate the dynamic of the YFV infection within the Southeast Region, genetic analyses were conducted on a smaller data set (data set 2) including a larger and updated data set of recently released data of the YFV 2016 to 2019 epidemic in Brazil belonging to the SA1 lineage ($n = 137$). Thus, to understand the transmission and the spatiotemporal evolution of YFV SA1 lineage 1 from this data set, we generated a subset (data set 3) that included all identified sequences from that lineage ($n = 80$). Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were estimated using RAxML (28) under a GTR + Γ_4 nucleotide substitution model. Statistical support for phylogenetic nodes was estimated using a ML bootstrap approach with 1,000 replicates.

In order to investigate the temporal signal in our YFV data sets 2 and 3, we regressed root-to-tip genetic distances from this ML tree against sample collection dates using TempEst v.1.5.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) (29).

Dated phylogenetics. To estimate time-calibrated phylogenies dated from time-stamped genome data, we conducted phylogenetic analysis using a Bayesian software package (24). Here, we used the GTR + Γ_4 nucleotide substitution model and Bayesian Skygrid tree prior (30) with an uncorrelated relaxed clock with a lognormal distribution (31). We employed a stringent model selection analysis using both path sampling (PS) and stepping stone (SS) procedures to estimate the most appropriate molecular clock model for the Bayesian phylogenetic analysis. We tested (i) the strict molecular clock model, which assumes a single rate across all phylogeny branches, and (ii) the more flexible uncorrelated relaxed molecular clock model with a lognormal rate distribution (uncorrelated lognormal [UCLN]). Both SS and PS estimators indicated the strict molecular clock (Bayes factor = 4.3) as the best-fitted model to the data set under analysis. Analyses were run in duplicate in BEAST v.1.10.4 (24) for 50 million MCMC steps, sampling parameters, and trees every 5,000th step. A noninformative continuous time Markov chain reference prior on the molecular clock rate was used (32). Convergence of MCMC chains was checked using Tracer v.1.7.1 (33). Maximum clade trees were summarized using TreeAnnotator after discarding 10% as burn-in.

Phylogeographic analyses. To investigate the spread of YFV in Southeast Brazil, we analyzed in more detail SA1 lineage 1, which includes the $n = 80$ sequences (Fig. 4). We used a Skygrid coalescent tree prior (30) and a continuous phylogeographic model that uses a relaxed random walk to model the spatial diffusion of lineages. Dispersal velocity variation among lineages was modelled using a Cauchy distribution (34, 35). Virus diffusion through time and space was summarized using 1,000 phylogenies sampled at regular intervals from the posterior distribution (after exclusion of burn-in). Sampling locations of each georeferenced YFV sequence from the Espírito Santo and Rio de Janeiro states are listed in Table S1 in the supplemental material. Georeferenced and time-stamped sequences were analyzed in BEAST v.1.10.4 (24) using the BEAGLE library (36) to enhance computational speed.

Data availability. New sequences were deposited in GenBank under accession numbers MK882599 to MK882604, MK882607 to MK882613, MK882615, MK882617 to MK882619, and MK882621 (see Table 2).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all personnel from Health Surveillance System in Rio de Janeiro that coordinated surveillance and helped with data collection and assembly. We also thank Ronaldo Lapa e Solange Regina Conceição from the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro) for their support.

This work was supported by the ZIBRA2 project supported by the Brazilian Ministry of Health (SVS-MS) and the Pan American Organization (OPAS) and founded by Decit/SCITE/MoH and CNPq (440685/2016-8 and 440856/2016-7); by CAPES (88887.130716/2016-00, 88881.130825/2016-00, and 88887.130823/2016-00); and by EU's Horizon 2020 program through ZIKAlliance (PRES-005-FEX-17-4-2-33). The Flavivirus Laboratory activities was also supported by Faperj (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) under grant number E-26/2002.930/2016, by the International Development Research Centre (IDRC) Canada over the grant 108411-001 and Horizon 2020 through ZikaPlan and ZikAction under the grant's agreement numbers 734584 and 734857. M.G. is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

M.G., M.C.L.D.M., V.F., L.C.J.A., and A.M.B.D.F. conceived and designed the study. M.G., M.C.L.D.M., V.F., M.A.M.-G., A.F., J.X., J.G.D.J., C.D.D.S.R., C.C.D.S., P.C.S., S.A.S., F.L.L.C., F.D.B.N., and J.T. performed investigations. M.G., M.C.L.D.M., V.F., T.G., J.T., N.R.F., A.P.M.R., D.G.R., A.L.D.A., W.K.O., R.F.D.C.S., C.F.C.D.A., T.D.O., C.A.F., S.F.A., R.V.C., A.C., L.C.J.A., and A.M.B.D.F. curated the data. M.G., V.F., T.G., J.T., N.R.F., L.C.J.A., and A.M.B.D.F. performed formal analysis. M.G., M.C.L.D.M., V.F., L.C.J.A., and A.M.B.D.F. wrote

the original draft of the paper and M.G., M.C.L.D.M., T.D.O., P.C.S., A.P.M.R., D.G.R., R.V.C., N.R.F., and A.M.B.D.F. revised the paper. A.P.M.R., D.G.R., A.L.D.A., W.K.O., R.F.D.C.S., C.F.C.D.A., C.A.F., S.F.A., R.V.C., A.C., and A.M.B.D.F. provided resources.

We declare no competing interests.

REFERENCES

- Barrett AD, Monath TP. 2003. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Adv Virus Res* 61:291–315. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)61007-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)61007-9).
- Monath TP, Vasconcelos PF. 2015. Yellow fever. *J Clin Virol* 64:160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>.
- Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. 2007. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog* 3:e75. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030075>.
- Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. 2001. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol* 75:6999–7008. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6999-7008.2001>.
- Nunes MR, Palacios G, Cardoso JF, Martins LC, Sousa EC, Jr, de Lima CP, Medeiros DB, Savji N, Desai A, Rodrigues SG, Carvalho VL, Lipkin WI, Vasconcelos PF. 2012. Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol* 86:13263–13271. <https://doi.org/10.1128/JVI.00565-12>.
- Chang GJ, Cropp BC, Kinney RM, Trent DW, Gubler DJ. 1995. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J Virol* 69:5773–5780.
- Dégallier N, Travassos da Rosa AP, Hervé JP, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC, Silva C. 1992. A comparative study of yellow fever in Africa and South America. *J Braz Assoc Advanc Sci* 44:143–151.
- Mondet B, da Rosa AP, Vasconcelos PF. 1996. The risk of urban yellow fever outbreaks in Brazil by dengue vectors. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Bull Soc Pathol Exot* 89:107–113.
- Souza RPD, Petrella S, Coimbra TLM, Maeda AY, Rocco IM, Bisordi I, Silveira VR, Pereira LE, Suzuki A, Silva SJD, Silva FG, Salvador FS, Tubaki RM, Menezes RT, Pereira M, Bergo ES, Hoffmann RC, Spinola RMF, Tengan CH, Siciliano MM. 2011. Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus* (*Conopostegus*) *leucocelaenus* (diptera, culicidae) in São Paulo State, Brazil, 2009. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53:133–139. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652011000300004>.
- Ribeiro AF, Cavalin RF, Abdul Hamid Suleiman JM, Alves da Costa J, Januária de Vasconcelos M, Sant'Ana Málague CM, Sztajnibok J. 2019. Yellow fever: factors associated with death in a hospital of reference in infectious diseases, São Paulo, Brazil, 2018. *Am J Trop Med Hyg* 101:180–188. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0882>.
- 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 CH, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J, Obolski U, Abade L, Vasylyeva TL, Giovanetti M, Yi D, Weiss DJ, Wint GRW, Shearer FM, Funk S, Nikolay B, Fonseca V, Adelino TER, Oliveira MAA, Silva MVF, Sacchetto L, Figueiredo PO, Rezende IM, Mello EM, Said RFC, Santos DA, Ferraz ML, Brito MG, Santana LF, Menezes MT, Brindeiro RM, Tanuri A, Dos Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Rocco IM, et al. 2018. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361:894–899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>.
- Abreu FVS, Delatorre E, dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, de Castro MG, Ribeiro IP, Furtado ND, Vargas WP, Ribeiro MS, Meneguete P, Bonaldo MC, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R. 2019. Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 114:e190076. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076>.
- Brazilian Ministry of Health. 2017. Epidemiological update yellow fever. Brazilian Ministry of Health, Brasília, Brazil. http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf.
- Brazilian Ministry of Health. 2018. Epidemiological update yellow fever. Brazilian Ministry of Health, Brasília, Brazil.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. 2019. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil—2018/2019. Ministério da Saúde, Brasília, Brazil.
- Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, Brady OJ, Marinho F, Deshpande A, Longbottom J, Browne AJ, Kraemer MUG, O'Reilly KM, Hombach J, Yactayo S, de Araujo YEM, da Nóbrega AA, Mosser JF, Stanaway JD, Lim SS, Hay SI, Golding N, Reiner RC. 2017. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis* 17:1209–1217. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30419-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30419-X).
- Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gómez MM, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, Neves M, Bonelly I, de Miranda RM, Furtado ND, Raphael LMS, da Silva LFF, de Castro MG, Ramos DG, Romano APM, Kallás EG, Vicente ACP, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R, Bonaldo MC. 2019. Distinct YFV lineages co-circulated in the central-western and southeastern Brazilian regions from 2015 to 2018. *Front Microbiol* 24:1079. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01079>.
- Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, de Jesus JG, Gräf T, dos Santos Rodrigues CD, dos Santos CC, Sampaio SA, Chalhoub FLL, de Bruycker Nogueira F, Theze J, Romano APM, Ramos DG, de Abreu AL, Oliveira WK, do Carmo Said RF, de Albuquerque CFC, de Oliveira T, Fernandes CA, Aguiar SF, Chieppe A, Sequeira PC, Faria NR, Cunha RV, Alcantara LC, de Filippis AMB. 2019. Yellow fever virus spread in Rio de Janeiro and Espírito Santo, 2016–2019: phylodynamic assessment to improve intervention strategies. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/711994>.
- Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 40:2323–2330. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>.
- Domingo C, Patel P, Villah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, Niedrig M. 2012. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol* 50:4054–4060. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12>.
- Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, Burton DR, Lewis-Ximenez LL, de Jesus JG, Giovanetti M, Hill SC, Black A, Bedford T, Carroll MW, Nunes M, Alcantara LC, Jr, Sabino EC, Baylis SA, Faria NR, Loose M, Simpson JT, Pybus OG, Andersen KG, Loman NJ. 2017. Multiplex PCR method for MiniION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 12:1261–1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>.
- de Souza RP, Hill SC, Thézé J, Claro I, Aguiar RS, Dellicour D, Abade L, Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Salles FCS, Rocco IM, Maeda AY, Vasami FGS, Du Plessis L, Silveira PP, Giovanetti M, de Goes J, Quick J, Fernandes N, Guerra J, Réssio MRA, Cirqueira CS, Iglezias SD, Delgado JD, Macedo FLL, Timenetsky M, de Paula R, Spinola R, Deus JT, Mucci LF, Tubaki RM, Menezes RMT, Ramos PL, Abreu AL, Cruz LN, Loman N, Bispo A, Pybus OG, Alcantara LVJ, Sabino EC, Faria NR. 2019. Genomic surveillance of yellow fever virus epidemic waves in São Paulo, Brazil, 2017–2018. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/645341>.
- Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, Dos Santos FCP, Nogueira JS, D'Agostino LG, Komninakis SV, Witkin SS, Réssio RA, Maeda AY, Vasami FGS, Kaigawa UMA, de Azevedo LS, de Souza Facioli PA, Macedo FLL, Sabino EC, Leal É, de Souza RP. 2019. Epizootics due to yellow fever virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci Rep* 9:5474. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41950-1>.
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4:vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
- Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RVD, Freire M, Martins RM, Homma A. 2018. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113:e180278.
- Garday JL, Loman NJ. 2017. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet* 19:9–20. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.88>.
- Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, de Jesus JG, Giovanetti M, Kraemer

- MUG, Hill SC, Black A, da Costa AC, Franco LC, Silva SP, Wu CH, Raghvani J, Cauchemez S, Du Plessis L, Verotti MP, de Oliveira WK, Carmo EH, Coelho GE, Santelli A, Vinhal LC, Henriques CM, Simpson JT, Loose M, Andersen KG, Grubaugh ND, Somasekar S, Chiu CY, Muñoz-Medina JE, Gonzalez-Bonilla CR, Arias CF, Lewis-Ximenez LL, Baylis SA, Chieppe AO, Aguiar SF, Fernandes CA, Lemos PS, Nascimento BLS, Monteiro HAO, Siqueira IC, de Queiroz MG, de Souza TR, Bezerra JF, Lemos MR, Pereira GF, Loudal D, et al. 2017. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* 546:406–410. <https://doi.org/10.1038/nature22401>.
28. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
29. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol* 2:vev007. <https://doi.org/10.1093/ve/vev007>.
30. Shapiro B, Rambaut A, Drummond AJ. 2006. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Mol Biol Evol* 23:7–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj021>.
31. Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4:e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>.
32. Ferreira MAR, Suchard MA. 2008. Bayesian analysis of elapsed times in continuous-time Markov chains. *Can J Stat* 36:355–368. <https://doi.org/10.1002/cjs.5550360302>.
33. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67:901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>.
34. Lemey P, Rambaut A, Welch JJ, Suchard MA. 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol Biol Evol* 27:1877–1885. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq067>.
35. Pybus OG, Suchard MA, Lemey P, Bernardin FJ, Rambaut A, Crawford FW, Gray RR, Arinaminpathy N, Stramer SL, Busch MP, Delwart EL. 2012. Unifying the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15066–15071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206598109>.
36. Ayres DL, Darling A, Zwickl DJ, Beerli P, Holder MT, Lewis PO, Huelsenbeck JP, Ronquist F, Swofford DL, Cummings MP, Rambaut A, Suchard MA. 2012. BEAGLE: an application programming interface and high-performance computing library for statistical phylogenetics. *Syst Biol* 61:170–173. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr100>.

RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

YELLOW FEVER

Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential

N. R. Faria^{1,2,3,4}, M. U. G. Kraemer^{1,2,3,4}, S. C. Hill^{1,2}, J. Goes de Jesus^{4,5}, R. S. Aguiar^{2,6}, F. C. M. Iani^{6,7,8}, J. Xavier⁴, J. Quick⁹, L. du Plessis¹, S. Dellicour⁹, J. Théze¹, R. D. O. Carvalho⁷, G. Baele⁹, C.-H. Wu¹⁰, P. P. Silveira⁵, M. B. Arruda⁵, M. A. Pereira⁶, G. C. Pereira⁶, J. Lourenço¹, U. Obolski¹, L. Abade^{1,11}, T. I. Vasylyeva⁴, M. Giovanetti^{4,7}, D. Yi¹², D. J. Weiss¹³, G. R. W. Wint¹, F. M. Shearer¹³, S. Funk¹⁴, B. Nikolay^{15,16}, V. Fonseca^{7,17}, T. E. R. Adelino⁸, M. A. A. Oliveira⁶, M. V. F. Silva⁶, L. Sacchetto⁷, P. O. Figueiredo⁷, I. M. Rezende⁷, E. M. Mello⁷, R. F. C. Said¹⁸, D. A. Santos¹⁹, M. L. Ferraz¹⁸, M. G. Brito¹⁸, L. F. Santana¹⁸, M. T. Menezes⁸, R. M. Brindeiro², A. Tanuri², F. C. P. dos Santos¹⁰, M. S. Cunha¹⁰, J. S. Nogueira¹⁰, I. M. Rocco¹⁰, A. C. da Costa²⁰, S. C. V. Kominakis^{21,22}, V. Azevedo⁷, A. O. Chieppe²³, E. S. M. Aranjó⁴, M. C. L. Mendonça⁴, C. C. dos Santos⁴, C. D. dos Santos⁴, A. M. Mares-Guia⁴, R. M. R. Nogueira⁴, P. C. Sequeira⁴, R. G. Abreu²⁴, M. H. O. Garcia²⁴, A. L. Abreu²⁵, O. Okumoto²⁵, E. G. Kroon⁷, C. F. C. de Albuquerque²⁶, K. Lewandowski²⁷, S. T. Pullan²⁷, M. Carroll²⁸, T. de Oliveira^{4,27,29}, E. C. Sabino³⁰, R. P. Souza³⁰, M. A. Suchard^{30,31}, P. Lemey⁹, G. S. Trindade⁷, B. P. Druanond⁷, A. M. B. Filippis⁴, N. J. Loman⁹, S. Cauchemez^{15,16,4}, L. C. J. Alcantara^{4,7,4}, O. G. Pybus^{1,4}

The yellow fever virus (YFV) epidemic in Brazil is the largest in decades. The recent discovery of YFV in Brazilian *Aedes* species mosquitos highlights a need to monitor the risk of reestablishment of urban YFV transmission in the Americas. We use a suite of epidemiological, spatial, and genomic approaches to characterize YFV transmission. We show that the age and sex distribution of human cases is characteristic of sylvatic transmission. Analysis of YFV cases combined with genomes generated locally reveals an early phase of sylvatic YFV transmission and spatial expansion toward previously YFV-free areas, followed by a rise in viral spillover to humans in late 2016. Our results establish a framework for monitoring YFV transmission in real time that will contribute to a global strategy to eliminate future YFV epidemics.

Yellow fever (YF) is responsible for 29,000 to 60,000 deaths annually in South America and Africa (1) and is the most severe mosquito-borne infection in the tropics (2). Despite the existence of an effective YF vaccine since 1937 (3), an estimated >400 million unvaccinated people live in areas at risk of infection (4). Yellow

fever virus (YFV) is a member of the *Flaviviridae* family and is classified into four genotypes: East African, West African, South American I, and South American II (5–9). In the Americas, YFV transmission occurs mainly via the sylvatic cycle, in which nonhuman primates (NHPs) are infected by tree-dwelling mosquito vectors such

as *Haemagogus* spp. and *Sabethes* spp. (10, 11). YFV transmission can also occur via an urban cycle, in which humans are infected by *Aedes* spp. mosquitoes that feed mostly on humans (12, 13).

Brazil has recently experienced its largest-recorded YF outbreak in decades, with 2043 confirmed cases and 676 deaths since December 2016 (supplementary text and fig. S1) (14). The last YF cases in Brazil attributed to an urban cycle were in Sena Madureira, in the northern state of Acre, in 1942 (15). An intensive eradication campaign eliminated *Aedes aegypti* and YF from Brazil in the 1950s (16), but the vector became reestablished in the 1970s and *Aedes* spp. mosquitoes are now abundant across most of Brazil (17). The consequences of a reignition of urban cycle transmission in Brazil would be serious, as an estimated 35 million people in areas at risk for YFV transmission in Brazil remain unvaccinated (4). New surveillance and analytical approaches are therefore needed to monitor this risk in real time.

Yellow fever virus outbreak in Brazil, 2016–2017

Between December 2016 and the end of June 2017, there were 777 polymerase chain reaction (PCR)-confirmed human cases of YF across 10 Brazilian states—mostly in Minas Gerais (MG) (60% of cases), followed by Espírito Santo (32%), Rio de Janeiro (3%), and São Paulo (3%) (18). The fatality ratio of severe YF cases was estimated at 33.6%, comparable to previous outbreaks (29, 20). Despite the exceptional magnitude and rapid expansion of the outbreak, little is known about its genomic epidemiology. Further, it is uncertain how the virus is spreading through space, as well as between humans and NHPs, and analytical insights into the contribution of the urban cycle to ongoing transmission are lacking.

To characterize the 2017 YFV outbreak in Brazil, we first compared time series of confirmed cases in humans ($n = 683$) and NHPs ($n = 313$) reported until October 2017 by public health institutes in MG, the epicenter of the outbreak (Fig. 1, A and B, and fig. S2). The time series are strongly associated (cross-correlation coefficient = 0.97; $P < 0.001$). Both peak in late January 2017, and we estimate that human cases lag behind those in NHPs by 4 days (table S1). NHP cases are geographically more dispersed

¹Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK. ²Computational Epidemiology Lab, Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA. ³Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ⁴Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ⁶Laboratório Central de Saúde Pública, Instituto Octávio Magalhães, FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁷Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁸Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham, Birmingham, UK. ⁹Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium. ¹⁰Department of Statistics, University of Oxford, Oxford, UK. ¹¹The Global Health Network, University of Oxford, Oxford, UK. ¹²Department of Statistics, Harvard University, Cambridge, MA, USA. ¹³Malaria Atlas Project, Big Data Institute, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, UK. ¹⁴Faculty of Epidemiology and Population Health, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. ¹⁵Mathematical Modelling of Infectious Diseases and Center of Biomaterials, Institut Pasteur, Paris, France. ¹⁶CNRS UMR2000: Génomique Évolutive, Modélisation et Santé, Institut Pasteur, Paris, France. ¹⁷KwaZulu-Natal Research, Innovation and Sequencing Platform (KRISP), School of Laboratory Medicine and Medical Sciences, University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa. ¹⁸Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ¹⁹Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil. ²⁰Instituto de Medicina Tropical e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ²¹Retrovirology Laboratory, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ²²School of Medicine of ABC (FMABC), Clinical Immunology Laboratory, Santo André, São Paulo, Brazil. ²³Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ²⁴Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília-DF, Brazil. ²⁵Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Brasília-DF, Brazil. ²⁶Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), Brasília-DF, Brazil. ²⁷Public Health England, National Infections Service, Porton Down, Salisbury, UK. ²⁸NHRI HPRU in Emerging and Zoonotic Infections, Public Health England, London, UK. ²⁹Centre for the AIDS Programme of Research in South Africa (CAPRISA), Durban, South Africa. ³⁰Department of Biostatistics, UCLA Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, CA, USA. ³¹Department of Biomathematics and Human Genetics, David Geffen School of Medicine at UCLA, University of California, Los Angeles, CA, USA.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author: Email: nuno.faria@zoo.ox.ac.uk (N.R.F.); luiz.alcantara@ioc.fiocruz.br (L.C.J.A.); oliver.pybus@zoo.ox.ac.uk (O.G.P.)

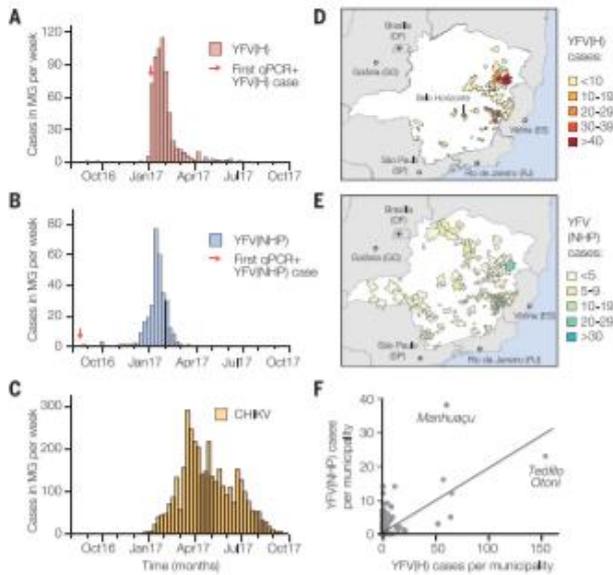


Fig. 1. Spatial and temporal epidemiology of YFV and CHIKV in Minas Gerais (MG). (A) Time series of human (H) YFV cases in MG (676 cases across 61 municipalities)—confirmed by serology, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR), or virus isolation—during the first YFV epidemic wave (August 2016 to October 2017). (B) Same as in (A) but showing NHP YFV cases (313 cases across 90 municipalities) confirmed by RT-qPCR. (C) Same as in (A) but showing human CHIKV cases (3668 cases across 129 municipalities). (D) Geographic distribution of human YFV cases in MG. (E) Geographic distribution of NHP YFV cases in MG. Figure S3 shows the corresponding geographic distribution of CHIKV cases. (F) Association between the number of human and NHP cases in each municipality of MG (Pearson's $r = 0.62$; $P < 0.0001$; nonparametric Spearman's rank $\rho = 0.32$; $P < 0.05$).

in MG than human cases, which are more concentrated in the Teófilo Ottoni and Manhuaçu municipalities (Fig. 1, D and E). Despite this, the numbers of human and NHP cases per municipality are positively correlated (Fig. 1F).

To establish whether human cases are acquired in proximity to potential sources of sylvatic infection, we estimated the distance between the municipality of residence of each human case and the nearest habitat of potential transmission, determined by using the enhanced vegetation index (EVI) (27) (supplementary materials). The average minimum distance between areas with $EVI > 0.4$ and the residence of confirmed human cases is only 5.3 km. In contrast, a randomly chosen resident of MG lives, on average, ≈ 51 km away from areas with $EVI > 0.4$. Similarly, human YFV cases reside, on average, 1.7 km from the nearest NHP case, whereas the mean minimum distance of a randomly chosen MG resident to the nearest NHP case is 39.1 km. This is consistent with YFV infection risk being greatest for people who reside or work in forested areas where sylvatic transmission occurs. We find that most human cases (98.5%) were reported in municipalities with estimated YFV vaccination coverage above the 80% threshold recommended by the World Health Organization (WHO). On average, human cases would need to travel 65 km from their place of residence to reach an area where vaccination coverage is $< 80\%$ (4).

Risk of YFV urban transmission

YFV was detected in *Aedes albopictus* mosquitoes caught in MG in January 2017 (22). Further, experiments suggest that *Aedes* spp. mosqui-

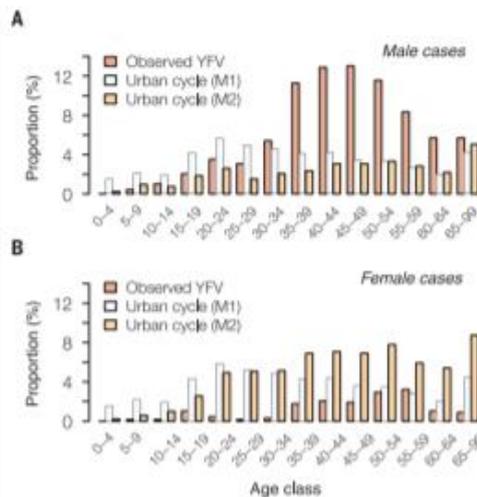


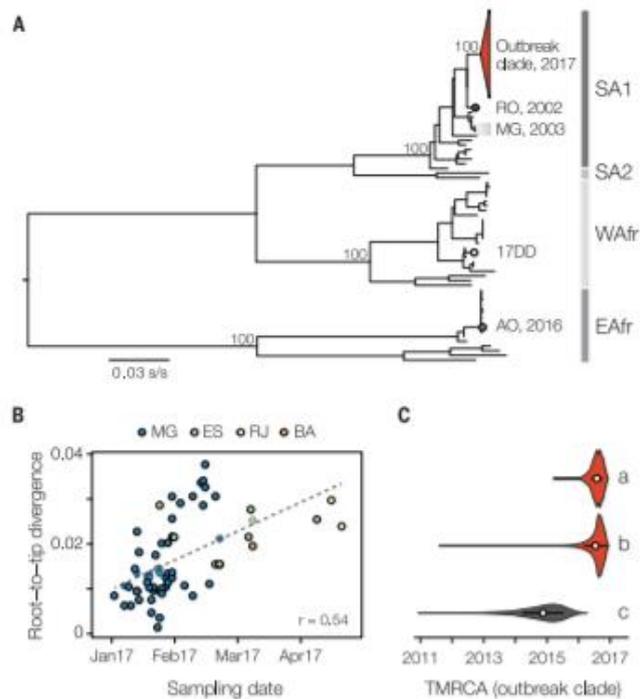
Fig. 2. Age and sex distribution of YFV cases in MG, 2016–2017. Red bars show the proportion of observed YFV cases in MG that occur in each age class, in (A) males and (B) females. These empirical distributions are different from those predicted under two models (M1, pale blue bars; M2, orange bars) of urban cycle transmission (see text for details).

toes from southeast Brazil can transmit Brazilian YFV, although perhaps less effectively than vectors from elsewhere in the country (23, 24). It is therefore important to investigate whether YFV cases in MG occur where and when *Aedes* spp. vectors are active. To do so, we analyzed confirmed chikungunya virus (CHIKV) cases from MG (Fig. 1C).

CHIKV is transmitted by the urban mosquitoes *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (25). There

were 3755 confirmed CHIKV cases in MG during January 2015 to October 2017. The CHIKV epidemic in MG in 2017 began later and lasted longer than the YFV outbreak (Fig. 1C), consistent with the hypothesis that YFV and CHIKV in the region are transmitted by different vector species. However, 29 municipalities with human YFV cases also reported CHIKV cases (Fig. 1D and fig. S3), indicating that YFV is indeed present in municipalities with *Aedes* mosquitoes. The mean

Fig. 3. Molecular phylogenetics of the Brazilian YFV epidemic. (A) Maximum likelihood phylogeny of complete YFV genomes showing the outbreak clade (red triangle) within the South American I (SA1) genotype (Fig. 4 and fig. S5). SA2, WAfr, and EAfr indicate the South America II, West Africa, and East Africa genotypes, respectively. For clarity, five YFV strains introduced to Venezuela from Brazil (49) are not shown. The scale bar is in units of substitutions per site (s/s). Node labels indicate bootstrap support values. RO 2002, strain BeH655417 from Roraima; MG 2003, two strains from the previous YF outbreak in MG in 2003; 17DD, the vaccine strain used in Brazil; AO 2016, YFV outbreak Angola in 2015–2016 (23). (B) Root-to-tip regression of sequence sampling date against genetic divergence from the root of the outbreak clade (fig. S6). Sequences are colored according to sampling location (MG, Minas Gerais; ES, Espírito Santo; RJ, Rio de Janeiro; BA, Bahia). (C) Violin plots showing estimated posterior distributions (white circles denote means) of the time of the most recent common ancestor (TMRCA) of the outbreak clade. Estimates were obtained using two different datasets (gray, SA1 genotype; red, outbreak clade) and under different evolutionary models: a, uncorrelated lognormal relaxed clock (UCLN) model with a skygrid tree prior with covariates specifically, the time series data shown in Fig. 1, A to C; also see fig. S7); b, UCLN model with a skygrid tree prior without covariates; c, fixed local clock model (see supplementary materials).



YFV vaccination rate in districts with both YFV and CHIKV cases is 72.6% (range = 61 to 78%) (4). Thus, relatively high vaccination rates in the locations in MG where YFV spillover to humans occurs, and potentially lower vector competence (23, 24), may ameliorate the risk of establishment of an urban YFV cycle in the state. However, adjacent urban regions (including São Paulo and Rio de Janeiro) have lower vaccination rates (4), receive tens of millions of visitors per year (26), and have recently experienced many human YFV cases (20). Thus, the possibility of sustained urban YFV transmission in southern Brazil and beyond necessitates continual virological and epidemiological monitoring.

We sought to establish a framework to evaluate routes of YFV transmission during an outbreak from the characteristics of infected individuals. Specifically, we assessed whether an outbreak is driven by sylvatic or urban transmission by comparing the age and sex distributions of observed YFV cases with those expected under an urban cycle in MG. For example, an individual's risk of acquiring YFV via the sylvatic cycle depends on their likelihood to travel to forested areas, an occurrence that is typically highest among male adults (27). In contrast, under an urban cycle, we expect more uniform exposure across age and sex classes, similar to that observed for urban cases in Paraguay (28) and Nigeria (29).

The male-to-female sex ratio of reported YFV cases in MG is 5.7 (85% of cases are male), and incidence is highest among males aged 40 to 49 (Fig. 2). We compared this distribution to that expected under two models of urban cycle transmission (supplementary materials). In model M1, age and sex classes vary in vaccination status but are equally exposed to YFV, a scenario that is typical of arboviral transmission (30). Under model M1, predicted cases are characterized by a sex ratio >1 , and incidence peaks among individuals aged 20 to 25 (Fig. 2). In model M2, we assume that the pattern of YFV exposure among age and sex classes follows that observed for CHIKV. The sex ratio of reported CHIKV cases in MG is 0.49 (33% of cases are male) (fig. S4). Under model M2, predicted incidence is highest in females aged >30 . The discrepancy between the observed distribution and that predicted under the two urban cycle models indicates that the YFV epidemic in MG is dominated by sylvatic transmission. This method shows that age- and sex-structured epidemiological data can be used to qualitatively evaluate the mode of YFV transmission during an outbreak.

Genomic surveillance of the Brazilian YFV outbreak

During a YFV outbreak, it is important to undertake virological surveillance to (i) track epidemic origins and transmission hotspots, (ii) character-

ize genetic diversity to aid molecular diagnostics, (iii) detect viral mutations associated with disease severity, and (iv) exclude the possibility that human cases are caused by vaccine reversion. We generated 62 complete YFV genomes from infected humans ($n = 33$) and NHPs ($n = 29$) from the most affected Brazilian states, including MG ($n = 51$), Espírito Santo ($n = 8$), Rio de Janeiro ($n = 2$), and Bahia ($n = 1$) (Fig. 3 and table S3). We also report two genomes from samples collected in 2003 during a previous YFV outbreak in MG from 2002 to 2003 (37). Genomes were generated in Brazil using a combination of methods (tables S5 to S7); half were generated in MG using a MinION portable YFV sequencing protocol adapted from (32) (tables S4 and S5). This protocol was made publicly available in May 2017 after the completion of pilot sequencing experiments using a cultured vaccine strain (supplementary materials). Median genome coverages were similar for samples obtained from NHPs [99%; median cycle threshold value (Ct) = 11] and from human cases (99%; median Ct = 16) (tables S5 to S7).

To put the newly sequenced YFV genomes in a global context, we added our genomes to a pool of 61 publicly available genomes (33, 34). We developed and applied an automated online phylogenetic tool to identify and classify YFV gene sequences (also publicly available, see supplementary materials). Phylogenies estimated by

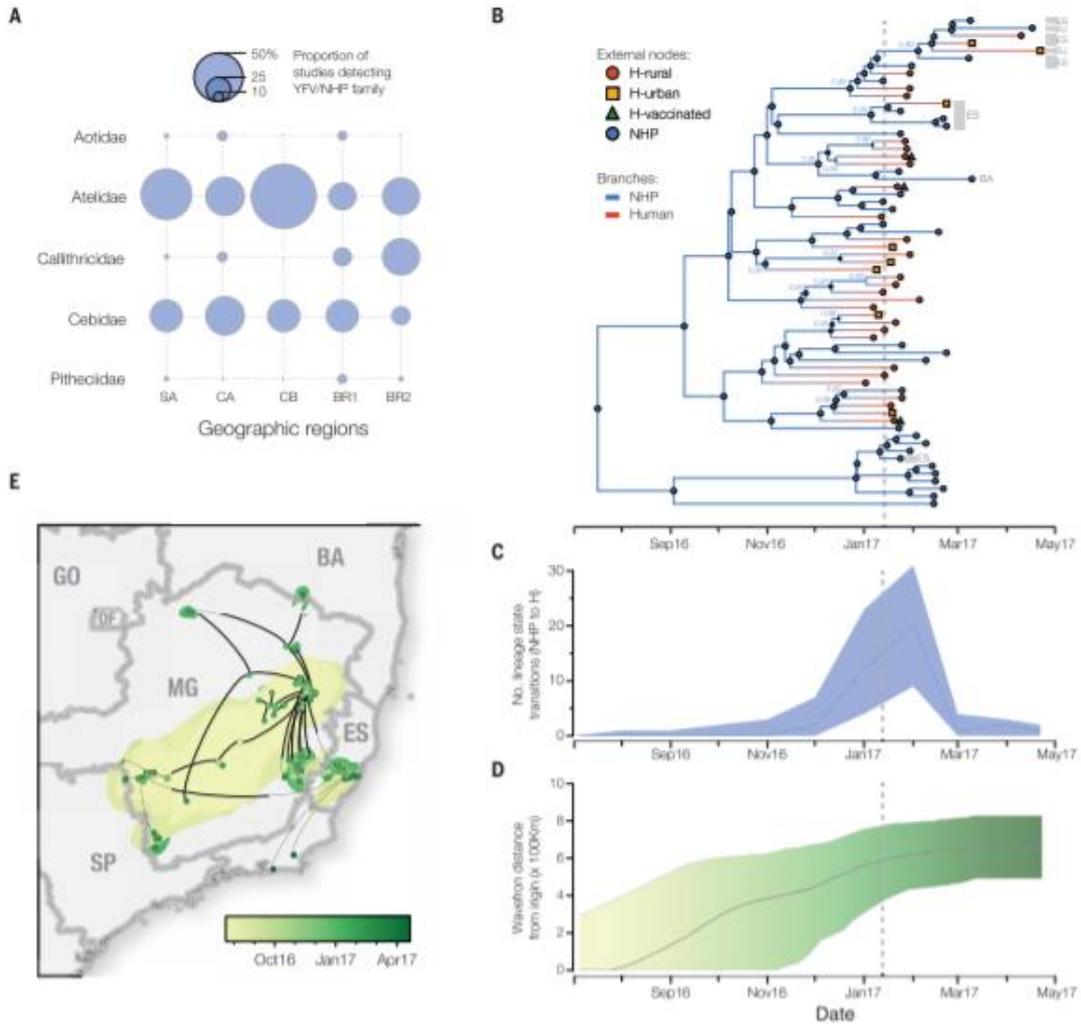


Fig. 4. Spatial and evolutionary dynamics of YFV outbreak. (A) Frequency of detection of YFV in NHPs in the Americas (50). Circle sizes represent the proportion of published studies ($n = 15$) that have detected YFV in each primate family and region. SA, South America (except Brazil); CA, Central America; CB, Caribbean; BR1, Brazil (before 2017); BR2, Brazil (this study). (B) Maximum clade credibility phylogeny inferred under a two-state (human and NHP) structured coalescent model. External node symbols denote sample type. Gray bars and labels indicate sample location (RJ, Rio de Janeiro; ES, Espírito Santo; BA, Bahia; others were sampled in MG). Internal nodes whose posterior state probabilities are >0.8 are annotated by circles. Node labels indicate posterior state probabilities for selected nodes. Internal branches are blue for NHPs and red for humans. Figure S8 shows a fully annotated tree. (C) Average number of YFV phylogenetic state

transitions (from NHPs to humans) per month. Solid line, median estimate; shaded area, 95% BCI. (D) Expansion of the YFV epidemic wavefront estimated using a continuous phylogeographic approach (35). At each time point the plot shows the maximum spatial distance between phylogeny branches and the inferred location of outbreak origin. Solid line, median estimate; shaded area, 95% BCI. The dashed lines in (B) to (D) indicate when YFV was declared a public health emergency in MG (13 January 2017). (E) Reconstructed spatiotemporal diffusion of the YFV outbreak. Phylogeny branches are arranged in space according to the locations of phylogeny nodes (circles). Locations of external nodes are known, whereas those of internal nodes are inferred (44). DF, Distrito Federal; GO, Goiás; SP, São Paulo. Shaded regions represent 95% credible regions of internal nodes. Nodes and uncertainty regions are colored according to time.

this tool, along with maximum likelihood and Bayesian methods, consistently place the Brazilian outbreak strains in a single clade within the South America I (SAI) genotype with maximum statistical support (bootstrap = 100%; posterior probability > 0.99) (Fig. 3A and fig. S5).

The outgroup to the outbreak clade is strain BeH655417, a human case sampled in Alto Alegre, Roraima, north Brazil, in 2002. In contrast, isolates sampled during the previous outbreak in MG in 2003 are more distantly related to the outbreak clade within the SAI genotype (Fig. 3A). Thus, the 2017 outbreak was more likely caused by a YFV strain introduced from an endemic area, possibly northern or center-west Brazil (35), than by the reemergence of a lineage that had persisted in MG. Although low sampling densities mean that this conclusion is provisional, similar scenarios have been suggested for previous Brazilian epizootics (36). The 14-year gap between the current outbreak and the date of the most closely related nonoutbreak strain agrees with the reported periodicity of YF outbreaks in northern Brazil (37), thought to be dictated by vector abundance and the accumulation of susceptible NHP hosts (38, 39).

At least seven humans from MG with PCR-confirmed YFV received a YF vaccine before the onset of symptoms. To test that these occurrences were caused by natural infection, and not by vaccine reactivation, we sequenced the YFV genomes from three of these cases (Fig. 3A and table S3). Our phylogenetic analysis clearly shows that these represent natural infections caused by the ongoing outbreak and are conclusively not derived from the 17DD vaccine strain (which belongs to the West African YFV genotype) (Fig. 3A and fig. S6).

Unifying YFV epidemiology and molecular evolution

Virus genomes are a valuable source of information about epidemic dynamics (39) but are rarely used to investigate specific YFV outbreaks in detail. Here we show how a suite of three analytical approaches, which combine genetic, epidemiological, and spatial data, can provide insights into YFV transmission.

First, we used a Bayesian method (40) to explore potential covariates of fluctuations in the effective population size of the YFV outbreak in 2017. After finding that genetic divergence in the outbreak clade accumulates over the time scale of sampling (Fig. 3B and fig. S6), albeit weakly, we sought to determine which epidemiological time series best describe trends in inferred YFV effective population size. We found that effective population size fluctuations of the YFV outbreak are well explained by the dynamics of both human and NHP YFV cases (inclusion probability: 0.37 for human cases and 0.63 for NHP cases) (table S8). These two YFV time series explain the genetic diversity dynamics of the ongoing outbreak 10³ times more effectively than CHIKV incidence (inclusion probability < 0.001), which represents transmission by *Aedes* spp. vectors. One benefit of this approach is that epidemiological

data contribute to estimation of the outbreak time scale. By incorporating YFV incidence data into evolutionary inference, we estimate the time of the most recent common ancestor (TMRCA) of the outbreak clade to be late July 2016 [95% Bayesian credible interval (BCI): March to November 2016] (Fig. 3C and fig. S7), consistent with the date of the first PCR-confirmed case of YFV in a NHP in MG (Jul 2016). The uncertainty around the TMRCA estimate is reduced by 30% when epidemiological and genomic data are combined, compared with genetic data alone (Fig. 3C).

Second, to better understand YFV transmission between humans and NHPs, we measured the movement of YFV lineages between the NHP reservoir and humans, using a phylogenetic structured coalescent model (41). Although previous studies have confirmed that YFV is circulating in five neotropical NHP families (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Pitheciidae, and Cebidae) (Fig. 4A), thus far NHP YFV genomes during the 2017 outbreak have been recovered only from *Alouatta* spp. (family Cebidae) (33). In this analysis, we used the TMRCA estimate obtained above (Fig. 3C) to inform the phylogenetic time scale (Fig. 4B). All internal nodes in the outbreak phylogeny whose host state is well supported (posterior probability > 0.8) are inferred to belong to the NHP population, consistent with an absence of urban transmission and in agreement with the large number of NHP cases reported in southeast Brazil (20). Despite this, we caution that hypotheses of human-to-human transmission linkage should not be tested directly using phylogenetic data alone, owing to the large undersampling of NHP infections. Notably, the structured coalescent approach reveals substantial changes in the frequency of NHP-to-human host transitions through time, rising from zero around November 2016 and peaking in February 2017 (Fig. 4C). This phylogenetic trend matches the time series of confirmed YFV cases in MG (Fig. 1, A and B), demonstrating that viral genomes, when analyzed using appropriate models, can be used to quantitatively track the dynamics of zoonosis during the course of an outbreak (42).

Third, we used a phylogenetic relaxed random walk approach to measure the outbreak's spatial spread (43) (supplementary materials and methods and table S9). When projected through space and time (Fig. 4, D and E, and movie S1), the phylogeny shows a southerly dissemination of virus lineages from their inferred origin in MG toward densely populated areas, including Rio de Janeiro and São Paulo (where YF vaccination was not recommended until July 2017 and January 2018, respectively). We estimate that virus lineages move, on average, 4.25 km/day (95% BCI: 2.64 to 10.76 km/day) (44). This velocity is similar when human YFV terminal branches are removed (5.3 km/day) and therefore most likely reflects YFV lineage movement within the sylvatic cycle and not the movement of asymptomatic infected humans. These rates are higher than expected given the distances

typically travelled by NHPs in the region (45) and suggest the possibility that YFV lineage movement may have been aided by human activity—e.g., transport of infected mosquitoes in vehicles (46) or hunting or illegal trade of NHPs in the Atlantic forest (47, 48). The epidemic wavefront (maximum distance of phylogeny branches from the inferred epidemic origin) expanded steadily between August 2016 and February 2017 at an estimated rate of ~3.3 km/day. Therefore, by the time YF was declared a public health emergency in MG (13 January 2017; dashed lines in Fig. 4, B to D), the epidemic had already expanded ~600 km (Fig. 4D) and caused >100 reported cases in both humans and NHPs (Fig. 1). Notably, the first detection in humans in December 2016 was concomitant with the outbreak's spatial expansion phase (Fig. 4D) and the rise in estimated NHP-to-human zoonoses (Fig. 4C); both were likely driven by an increase in the abundance of sylvatic vectors. Thus, the outbreak lineage appeared to circulate among NHPs in a widening geographic area for several months before human cases were detected.

Conclusion

Epidemiological and genomic surveillance of human and animal populations at risk is crucial for early detection and rapid containment of YFV transmission. The YFV epidemic in Brazil continues to unfold with an increase in cases since December 2017. Longitudinal studies of NHPs are needed to understand how YFV lineages disseminate across South America between outbreaks and how epizootics are determined by the dynamics of susceptible animals in the reservoir. To achieve the WHO's goal to eliminate YF epidemics by 2026, YF surveillance necessitates a global, coordinated strategy. Our results and analyses show that rapid genomic surveillance of YFV, when integrated with epidemiological and spatial data, could help anticipate the risk of human YFV exposure through space and time and monitor the likelihood of sylvatic versus urban transmission. We hope that the toolkit introduced here will prove useful in guiding YF control in a resource-efficient manner.

REFERENCES AND NOTES

1. T. Garaski et al., *PLoS Med.* **11**, e1001638 (2014).
2. C. I. Paulos, A. S. Fauci, *N. Engl. J. Med.* **376**, 1397–1399 (2017).
3. M. Theiler, H. H. Smith, *J. Exp. Med.* **65**, 767–786 (1937).
4. F. M. Shearer et al., *Lancet Infect. Dis.* **17**, 1209–1217 (2017).
5. M. R. Nunes et al., *J. Virol.* **86**, 13263–13271 (2012).
6. J. P. Mulets, H. Wang, L. Li, J. E. Bryant, A. D. T. Barrett, *J. Virol.* **75**, 6999–7008 (2001).
7. J. J. von Linstern et al., *J. Gen. Virol.* **87**, 895–907 (2006).
8. E. Wang et al., *Virology* **225**, 274–281 (1996).
9. G. J. Chang, B. C. Cropp, R. M. Kinney, D. W. Trent, D. J. Guzik, *J. Virol.* **69**, 5773–5780 (1995).
10. M. N. O. Segura, F. C. C. Castro, *Atlas de Culicídeos na Amazônia Brasileira* (Instituto Evandro Chagas Press, 2007), vol. 367.
11. J. da C. Cardoso et al., *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1918–1924 (2010).
12. A. A. Grobbelaar et al., *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1854–1855 (2016).
13. M. U. G. Kraemer et al., *Lancet Infect. Dis.* **17**, 330–338 (2017).
14. O. Franco, *História da Febre Amarela no Brasil* (Ministério da Saúde, DNERJ, 1968).

15. R. A. G. B. Corsoli, R. Lourenço de Oliveira, *Prospéctas Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil* (Fiocruz, 1994).
16. J. Vainio, "Yellow fever" (World Health Organization, 1998).
17. M. U. Kraemer et al., *eLife* **4**, e08347 (2015).
18. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, "Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de Dezembro de 2016 a Julho de 2017" (Boletim Epidemiológico vol. 48, 2017); http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_037.pdf.
19. P. F. Vasconcelos et al., *J. Med. Virol.* **65**, 998–1004 (2001).
20. Pan American Health Organization/World Health Organization, "Epidemiological update yellow fever 16 Feb 2018" (PAHO/WHO, 2018); www.paho.org/hq/index.php?option=com_topnews&view=read&Itemid=2194&layout=40794&lang=en.
21. F. M. Shearer et al., *Lancet Glob. Health* **6**, e270–e278 (2018).
22. Instituto Evandro Chagas, www.iec.gov.br/porta/descoberta/ (2018).
23. R. Lourenço-de-Oliveira, M. Vazelle, A. M. B. de Fátima, A. B. Falcão, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**, 43–54 (2004).
24. D. Couto-Lima et al., *Sci. Rep.* **7**, 4848 (2017).
25. N. R. Faria et al., *PLoS Currents Outbreaks*, 10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e489b9464017556468c28b2 (2016).
26. N. R. Faria et al., *Sci. Rep.* **7**, 15216 (2017).
27. S. H. Tuboi, Z. G. A. Costa, P. F. da Costa Vasconcelos, D. Hatch, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**, 169–175 (2007).
28. PAHO, "Outbreak of Yellow Fever in Paraguay" (PAHO, 2009).
29. A. Noussi et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**, 401–406 (1989).
30. S. D. Thiberville et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2004 (2013).
31. M. Ribeiro, C. M. F. Antunes, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **42**, 523–531 (2009).
32. J. Quick et al., *Nat. Protoc.* **12**, 1261–1276 (2017).
33. M. C. Bonaldo et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **112**, 447–451 (2017).
34. A. Moreira-Soto et al., *Clin. Microbiol. Infect.* 10.1016/j.cmi.2018.01.026 (2018).
35. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, "Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: Situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal" (Boletim Epidemiológico vol. 46, 2015); <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/29/2015-032-FA-ok.pdf>.
36. P. F. C. Vasconcelos et al., *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1578–1584 (2004).
37. F. P. Câmara, A. L. B. B. Gomes, L. M. F. Carvalho, L. G. V. Castello, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**, 297–299 (2011).
38. P. F. Vasconcelos et al., *Cad. Saude Publica* **17** (suppl.), 155–164 (2001).
39. G. Dudas et al., *Nature* **544**, 309–315 (2017).
40. M. S. Gil, P. Lemey, S. N. Bennett, R. Blok, M. A. Suchard, *Syst. Biol.* **65**, 1041–1056 (2016).
41. T. G. Vaughan, D. Kühnert, A. Popinga, D. Welch, A. J. Drummond, *Bioinformatics* **30**, 2272–2279 (2014).
42. G. Dudas, L. M. Carvalho, A. Rambaut, T. Bedford, *eLife* **7**, e31257 (2018).
43. O. G. Pybus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 15066–15071 (2012).
44. P. Lemey, A. Rambaut, J. J. Welch, M. A. Suchard, *Mol. Biol. Evol.* **27**, 1877–1885 (2010).
45. L. Jang, I. Mourthe, C. E. V. Greife, K. B. Strick, J. P. Boubli, *PLoS ONE* **10**, e0129789 (2015).
46. E. Flacio, L. Engeler, M. Tonolla, P. Müller, *Parasit. Vectors* **9**, 304 (2016).
47. A. Estrada et al., *Sci. Adv.* **3**, e1600946 (2017).
48. R. A. Nascimento, R. A. M. Montano, *Neotrop. Biol. Conserv.* **8**, 79–87 (2013).
49. A. J. Augustine et al., *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 99–102 (2015).
50. P. R. Stephens et al., *Ecology* **98**, 1476 (2017).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank FUNED-MG and the Brazilian YFV surveillance network for their contributions. N.R.F. thanks J. F. Drexler for sharing data, N. Trovão for discussions, F. Campos for proof imaging, and P. Fonseca for proofreading. We thank Oxford Nanopore Technologies for technical support. L.C.J.A. thanks QiAGEN for reagents and equipment. A.C.d.C. and E.C.S. thank Illumina, Zymo Research, Sage Science, and Promega for donation of reagents. **Funding:** This work was supported in part by CNPq 400354/2016-0 and FAPESP 2036/0735-2. N.R.F. is supported by a Sir Henry Dale Fellowship (204311/Z/16/Z), internal GCRF grant 005073, and John Fell Research Fund grant 005166. This research received funding from the ERC (grant agreement 634725-PATHPHYLOOYN) and from the Oxford Martin School. M.U.G.K. acknowledges funding from a Branco Weiss Fellowship, administered by ETH Zurich, a Training Grant from the National Institute of Child Health and Human Development (T32D040128), and the National Library of Medicine of the National Institutes of Health (R01LM010812 and R01LM011965). S.D. is funded by the Fonds Wetenschappelijk Onderzoek (FWO, Flanders, Belgium). G.B. acknowledges support from the Interne Fonds van KU Leuven/Internal Funds KU Leuven. A.C.d.C. is funded by FAPESP 2017/00021-9.

B.B.N. and S.C. are supported by the EU's Horizon 2020 Programme through ZKAliance (grant 734548), the Investissement d'Avenir program, the Laboratoire d'Excellence Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases program (grant ANR-10-LABX-62-IBED), the Models of Infectious Disease Agent Study of the National Institute of General Medical Sciences, the AXA Research Fund, and the Association Robert Debré. P.L. and M.A.S. acknowledge funding from the European Research Council (grant agreement 725422-Reserve/DOC5) and from the Wellcome Trust Collaborative Award 206298/Z/17/Z. P.L. acknowledges support from the Research Foundation Flanders (Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek, Vlaanderen, G066215N, G005017N, and G0B9317N). **Author contributions:** N.R.F., L.C.J.A., S.C.H., A.M.B.F., M.U.G.K., S.C., and G.G.P. designed the study. S.C.H., J.J.G., R.S.d.A., F.C.M.I., J.X., R.D.O.C., J.T., M.G., L.C.J.A., and N.R.F. undertook fieldwork. S.C.H., J.J.G., A.C.d.C., S.C.F.K., V.F., and T.J.D. undertook experiments. N.R.F., L.d.P., J.T., S.D., G.B., G.G.P., C.H.W., T.I.V., and P.L. performed genetic analyses. M.U.G.K., S.C., S.F., J.L., U.O., L.A., D.Y., and N.R.F. performed epidemiological and cartographic analyses. B.N., F.M.S., and N.R.F. performed historical YFV review. N.R.F., M.U.G.K., L.C.J.A., S.C., and G.G.P. wrote the manuscript. E.C.S., J.T., L.d.P., R.P.S., P.L., C.F.C.d.A., R.S.d.A., and A.M.B.F. edited the manuscript. All other authors were involved in collection, processing, sequencing, and bioinformatics of samples and geographic data. All authors read and approved the contents of the manuscript. **Competing interests:** N.J.L. and L.C.J.A. received free-of-charge reagents in support of the project from Oxford Nanopore Technologies. A.C.d.C. and E.C.S. received reagents at no cost from Illumina, Zymo Research, Sage Science, and Promega. **Data and materials availability:** Raw data, code, and analysis files are available via the GitHub repository (<https://github.com/arbospread/YFV-monitoring>). See <https://github.com/2ibraproject/zika-pipeline/tree/master/schemes> for MinION sequencing protocols. Genome sequences generated here are available under GenBank accession numbers MH038064 to MH038115 and MH484423 to MH484434.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencemag.org/content/361/6405/894/suppl/DC1
Materials and Methods
Supplementary Text
Figs. S1 to S10
Tables S1 to S9
References (S1–107)
Movie S1
31 March 2018; accepted 20 July 2018
Published online 23 August 2018
10.1126/science.aar7125

