

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUCIANA MATOS DE ABREU STANZANI

**Culicídeos silvestres na epidemia de febre amarela no
estado do Espírito Santo, Brasil, 2017**

VITÓRIA
2023

LUCIANA MATOS DE ABREU STANZANI

**Culicídeos silvestres na epidemia de febre amarela no
estado do Espírito Santo, Brasil, 2017**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Doenças Infecciosas.

Orientador: Dr. Aloísio Falqueto

Coorientador: Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

VITÓRIA
2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M425" Matos de Abreu Stanzani, Luciana, 1973-
"Culicídeos silvestres na epidemia de febre amarela no estado
do Espírito Santo, Brasil, 2017 / Luciana Matos de Abreu
Stanzani. - 2023.
108 f. : il.

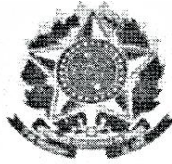
Orientador: Aloísio Falqueto.

Coorientador: Ricardo Lourenço de Oliveira.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Febre amarela. 2. Culicidae. 3. Vetores. I. Falqueto,
Aloísio. II. Lourenço de Oliveira, Ricardo. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

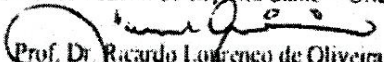
CDU: 61

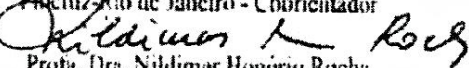


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

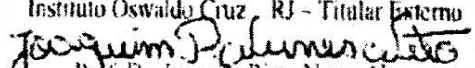
Ata da sessão de defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (PPGDI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do(a) discente Luciana Matos de Abreu Stanzani, candidato(a) ao título de Doutor(a) em Doenças Infecciosas, realizada às 15:00h do dia sete de fevereiro do ano dois mil e vinte e três por webconferência. O presidente da Banca, Prof. Dr. Aloísio Falqueto, apresentou os demais membros da comissão examinadora, constituídos pelos Doutores, Nildimar Honório Rocha (Instituto Oswaldo Cruz - RJ), Joaquim Pinto Nunes Neto (Instituto Evandro Chagas - PA), Crispim Cerutti Junior (UFES), Carlos Graeff Teixeira (UFES). Em seguida, cedeu a palavra ao candidato que em 50 minutos apresentou sua Tese intitulada "Culicídeos silvestres na epidemia de febre amarela no estado do Espírito Santo, Brasil, 2017". Terminada a apresentação do(a) discente, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. O presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Tese havia sido aprovada e que o(a) discente deve providenciar dentro do período de um mês a versão final. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e eu, Perlyson Pires de Carvalho, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, lavrei a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 7 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Aloísio Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo - Orientador


Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira
Fiocruz-Rio de Janeiro - Coorientador

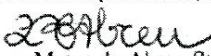

Prof. Dra. Nildimar Honório Rocha

Instituto Oswaldo Cruz - RJ - Titular Externo


Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto
Instituto Evandro Chagas - PA - Titular Externo

Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior
Universidade Federal do Espírito Santo - Titular Interno

Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira
Universidade Federal do Espírito Santo - Titular Interno


Luciana Matos de Abreu Stanzani
Discente

Vitória, 7 de fevereiro de 2023.



Centro de Ciências da Saúde - Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3535-7259 |

www.doencasinfeciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

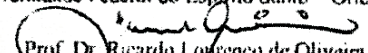
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

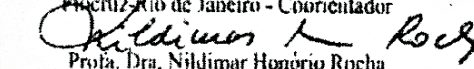
O(a) doutorando(a) Luciana Matos de Abreu Stanzani apresentou a tese intitulada “Culicídeos silvestres na epidemia de febre amarela no estado do Espírito Santo, Brasil, 2017” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.


Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (x) aprovar () reprovar a tese habilitando Luciana Matos de Abreu Stanzani a obter o Grau de Doutor (a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 7 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Aloisio Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador


Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira
Fiocruz Rio de Janeiro – Coorientador


Profa. Dra. Nildimar Honório Rocha
Instituto Oswaldo Cruz – RJ – Titular Externo


Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto
Instituto Evandro Chagas – PA – Titular Externo

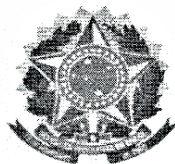
Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno



Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7259 |

www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DE DOUTORADO DO
CANDIDATO AO GRAU DE DOUTOR PELO PPGDI/UFES.

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “Culicídeos silvestres na epidemia de febre amarela no estado do Espírito Santo, Brasil, 2017” elaborada por Luciana Matos de Abreu Stanzani candidato(a) ao Grau de Doutor em Doenças Infecciosas recomendou, após apresentação da tese, realizada no dia 7 de fevereiro de 2023, que ela seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

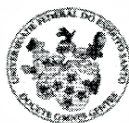
Reprovada

Os membros da Comissão deverão indicar a natureza de sua decisão através de sua assinatura na coluna apropriada que segue:

Aprovada

Reprovada

-----	-----
-----	-----
-----	-----

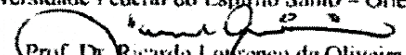


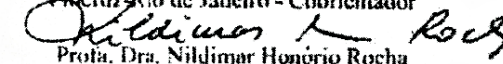
Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7259 |
www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

Prof. Dr. Aloisio Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo - Orientador


Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira
Fiocruz - Rio de Janeiro - Coorientador


Prof. Dra. Nildimar Honório Rocha
Instituto Oswaldo Cruz - RJ - Titular Externo


Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto
Instituto Evandro Chagas - PA - Titular Externo

Prof. Dr. Crispim Cerutu Junior
Universidade Federal do Espírito Santo - Titular Interno

Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira
Universidade Federal do Espírito Santo - Titular Interno



Centro de Ciências da Saúde - Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7259 |

www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALOISIO FALQUETO - SIAPE 295317
Departamento de Medicina Social - DMS/CCS
Em 08/02/2023 às 08:01

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/647125?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
CARLOS GRAEFF TEIXEIRA - SIAPE 1060820
Departamento de Patologia - DPA/CCS
Em 16/02/2023 às 16:56

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/654259?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
CRISPIM CERUTTI JUNIOR - SIAPE 1312483
Departamento de Medicina Social - DMS/CCS
Em 17/02/2023 às 10:06

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/654699?tipoArquivo=O>

Às vítimas de epidemias;

Aos familiares das vítimas de epidemias;

*Aos cientistas e profissionais da saúde, que dedicaram e que dedicam esforços para
prevenção, cuidado, diagnóstico, tratamento, vigilância, gestão, combate a vetores
de doenças e enfrentamento de crises sanitárias.*

Agradecimentos

Àqueles que compartilharam seu conhecimento, trabalho, apoio técnico, apoio afetivo e oração. É certo que em nenhuma etapa eu estive sozinha.

A Deus.

Aos meus orientadores:

Dr. Aloísio Falqueto, pela idealização do projeto, pela oportunidade a mim concedida, pelo incentivo durante a caminhada, pela confiança em mim depositada, pelo investimento em minha formação, pela competência e pelos ensinamentos preciosos, pela dedicação e pelo amor a esse trabalho, pela atuação fundamental no trabalho de campo e por ser sempre acessível e disponível quando precisei.

Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, pela oportunidade da colaboração com o LATHEMA, pelo incentivo e pela paciência em meu processo de aprendizagem, pela competência e pelos ensinamentos preciosos, pela dedicação a esse trabalho, pela atuação fundamental na elaboração do artigo e por ser sempre acessível e disponível quando precisei.

Às instituições financiadoras do projeto:

À empresa Vale S.A, pelo patrocínio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro;

À Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB), Ministério da Saúde;

Ao alojamento do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/FIOCRUZ-RJ.

Às instituições de afiliação:

À Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde por intermédio:

Do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, pela oportunidade de cursar o doutorado;

Do Departamento de Patologia, pela concessão do afastamento para o desenvolvimento das atividades experimentais;

À Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, pela colaboração para a realização de todo o trabalho.

Aos pesquisadores colaboradores e amigos:

Dra. Monique de Albuquerque Motta (LATHEMA/FIOCRUZ), pelos preciosos ensinamentos na taxonomia, pelo incentivo, paciência e confiança, por toda a dedicação e zelo com esse trabalho e por me inspirar a amar *Wyeomyia*;

Dr. Rafael Santos Erbisti (LES/UFF), pelos preciosos ensinamentos, pela análise dos dados e pela paciência, pela dedicação e pela disponibilidade sempre que precisei;

Dr. Filipe Vieira Santos de Abreu (IFNMG), pelos preciosos ensinamentos na temática do trabalho, pela paciência, pela dedicação e pela disponibilidade sempre que precisei;

Dr. Agostinho Cardoso Nascimento Pereira (LATHEMA/FIOCRUZ, UFMA), por dedicar noites e finais de semana me ensinando a identificação de mosquitos, por me inspirar a amar a taxonomia, pelo incentivo e pelas consultorias a qualquer hora;

Me. Maycon Sebastião Alberto Santos Neves (LATHEMA/FIOCRUZ), pelos preciosos ensinamentos na taxonomia, por me emprestar sua maravilhosa chave para *Sabethes*, pelo incentivo e pelas consultorias;

Glauber Rocha Pereira (LATHEMA/FIOCRUZ), pelos preciosos ensinamentos na identificação de mosquitos, pelo incentivo e pela serenidade;

Me. Anielly Ferreira de Brito (LATHEMA/FIOCRUZ), pelos preciosos ensinamentos na biologia molecular, pelo incentivo e pelas consultorias, pela confiança e por me abrigar em sua casa em momentos providenciais;

Gláucio Rocha Pereira (LATHEMA/FIOCRUZ), por trabalhar lado a lado comigo em pleno ápice da pandemia de Covid-19, doando seu tempo com dedicação, boa vontade e serenidade, sem medir esforços para me auxiliar na identificação de mosquitos;

Claudiney Biral dos Santos (SESA/MS), por ser o primeiro a me incentivar, pela dedicação gratuita e fundamental às coletas de mosquitos, pela competência e pelos ensinamentos preciosos;

Dr. Israel de Souza Pinto (IFPA), pela dedicação gratuita e fundamental às coletas de mosquitos;

Dr. Álvaro Adolfo Faccini Martínez (FUCS; SAI), pela dedicação gratuita e fundamental às coletas de mosquitos;

Dra. Creuza Rachel Vicente (UFES), pelo acompanhamento de todo esse trabalho desde o início, pela assessoria e pelos ensinamentos de forma sempre acessível e disponível;

Karina Ribeiro Leite Jardim Cavalcante (CGLAB/MS), pela colaboração para a realização das análises moleculares.

Aos pesquisadores da FIOCRUZ/RJ, especialmente:

Dra. Teresa Fernandes Silva do Nascimento, Chefe do LATHEMA à época, pelas sugestões, pelo incentivo, pelo apoio e pela confiança, por providenciar e autorizar tudo o que precisei no laboratório;

Dra. Nildimar Honório Rocha, pelas sugestões, pelo incentivo, pelo apoio, pela confiança, pelos ensinamentos e pelas oportunidades de cursar e colaborar em DetVetores;

Dra. Márcia Gonçalves Castro, pelo incentivo, pelo apoio e pelos ensinamentos;

Dra. Dinair Couto Lima, pelo incentivo, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos professores do PPGDI/UFES, especialmente:

Dr. Jaime Manoel Pinto Combadão;

Dra. Silvia Cristina de Paiva e Almeida.

Ao professor do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa:

Dr. José Marinaldo Gleriani.

Aos colegas técnicos da UFES e da FIOCRUZ, especialmente:

Steven Rios Ribeiro, Perlyson Pires de Carvalho, Heloisa Diniz, Rosilainy Surubi Fernandes, Alexandre da Silva Xavier, Maria Ignez Lima Bersot, Cristiane Maria Vicente, Marcelo Quintela, Marcelo Celestino dos Santos, Mauro Menezes Muniz, Renato Carvalho de Andrade (*in memoriam*), Joseane Carneiro Costa, Rogerio Teotonio Araújo, pelo suporte para a realização do trabalho.

Flavia Priscila Santos Freitas, Lorena Lima Viana e Simone Bravin Maifrede pelo incentivo e pelo suporte dado às minhas atividades laborais do Departamento de Patologia.

Aos trabalhadores da Fiocruz, das equipes de limpeza, de transporte, de manutenção de equipamentos, das portarias, da segurança; da administração.

Aos proprietários das áreas onde foram realizadas as amostragens entomológicas.

À Sra. Maria Inês Falqueto, pelo incentivo e carinho.

Aos amigos Adilson Pereira de Azevedo, por ser um anjo da guarda para mim no Rio de Janeiro, e **Telma Lúcia Moraes**, por todo o apoio e zelo, quando mais precisei.

Aos amigos da UFES, especialmente:

Cynara Oliveira Possamai, Danielle Lessa Junger, Steveen Rios Ribeiro, Adilson Carvalho da Fonseca, Luciana Cláudia Davel de Melo, Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler, Viviane Coutinho Meneguzzi.

Por trazerem amizade ao meu ambiente de trabalho.

Aos amigos de pós-graduação e aos de moradia, especialmente,

Bruna Groner Pereira; Gerson Fontana; Givago Gomes da Silva (UFES);

Agostinho Cardoso Nascimento Pereira; Paulino Siqueira Ribeiro; Rafaella Moraes de Miranda (FIOCRUZ);

Karina Leal de Oliveira (Curicica, Alojamento Hélio Fraga, Apartamento 19);

Renato Fonseca de Arruda e Rosilainy Surubi Fernandes (São Cristóvão, Casa 208).

Por estudarem comigo, por trocarem experiências e aprendizados, por serem suporte em horas difíceis, por tornarem meus dias de doutorado mais alegres, divertidos e suaves e por dividirem comigo essa parte marcante da vida.

À minha família e aos meus amigos,

Pelo amor e pelo carinho que têm por mim, pela preocupação para comigo, pela torcida para que desse tudo certo, pela espera da minha presença e pela compreensão da minha ausência. Eu amo vocês. Agradeço a todos por intermédio de:

Leida Matos de Abreu e Romel Pio de Abreu (mãe e pai);

Maria da Conceição Ribeiro Stanzani (sogra);

Lucilia Ribeiro Stanzani;

Marcelo Ribeiro Stanzani;

Martins de Alcântara Ribeiro;

André Stanzani Franca;

Maximiano da Franca Trineto.

Em especial a

Leandro Stanzani,

Por exercer todos os papéis de um companheiro durante essa jornada: cônjuge, amigo, fã, crítico, revisor, pesquisador, assessor e conselheiro.

E porque como em tudo em nossa vida, nós fizemos esse trabalho juntos.

*“Porque se chamavam homens
Também se chamavam sonhos
E sonhos não envelhecem”*

(Milton Nascimento, Lô Borges e Márcio Borges)

RESUMO

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda transmitida por mosquitos que pode ocorrer em um ciclo urbano ou silvestre. Evidências de febre amarela silvestre foram relatadas pela primeira vez em áreas de Mata Atlântica “sem *Aedes aegypti*” no Espírito Santo (ES), Brasil, durante um surto do vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* - YFV) de 1931 a 1940. Este estudo investigou as espécies de mosquitos envolvidas na transmissão do YFV durante o surto de 2017, aproximadamente, 80 anos após o último caso de febre amarela no ES. Um levantamento entomológico foi realizado em seis áreas florestais durante e após o pico da epidemia. Nós coletamos 10.658 mosquitos compreendendo 14 gêneros e 78 espécies. As espécies da tribo Sabethini foram as mais abundantes (80,67%) e diversas (51 táxons), seguidas por Aedini (16,62% dos espécimes coletados, compreendendo 14 táxons). *Haemagogus leucocelaenus* e *Hg. janthinomys/capricornii* foram considerados os principais vetores, pois tiveram uma abundância relativamente alta, coocorreram praticamente em todas as áreas e mostraram as maiores taxas de infecção pelo YFV (taxa mínima de infecção [MIR] = 32,5, estimativa de probabilidade máxima [MLE] = 32,1; MIR = 54,1, MLE = 35,8, respectivamente). *Sabethes chloropterus*, *Sa. Soperi*, *Sa. identicus*, *Aedes aureolineatus* e *Shannoniana fluviatilis* também foram encontrados naturalmente infectados pelo YFV e podem ter um papel secundário na transmissão. Este é o primeiro relato confirmando a infecção natural por YFV em *Sa. identicus*, *Ae. aureolineatus* e *Sh. fluviatilis*. Nosso estudo enfatiza a importância da manutenção de altas coberturas vacinais em áreas receptivas à transmissão do YFV, a importância de ações da vigilância entomológica na Mata Atlântica, assim como a necessidade de intervenções combinadas, integrando o hospedeiro humano, artrópodes vetores e primatas não-humanos visando reduzir a morbidade e mortalidade da febre amarela silvestre no Brasil.

Palavras-chave: Febre Amarela; Culicidae; Vetores.

ABSTRACT

Yellow fever is an acute mosquito-borne infectious disease that can occur in an urban or sylvatic cycle. Evidence of sylvatic yellow fever was first reported in Atlantic Forest areas “without *Aedes aegypti*” in Espírito Santo (ES), Brazil, during a *Yellow fever virus* (YFV) outbreak from 1931 to 1940. This study investigated the mosquito species involved in YFV transmission during the 2017 outbreak, ~80 years after the last YFV case in ES. An entomological survey was conducted in six forest areas during and after the peak of the epidemic. We collected 10,658 mosquitoes comprising 14 genera and 78 species. Species of the tribe Sabethini were the most abundant (80.67%) and diverse (51 taxa), followed by Aedini (16.62% of the specimens collected, comprising 14 taxa). *Haemagogus leucocelaenus* and *Hg. janthinomys/capricornii* were considered the main vectors as they had a relatively high abundance, co-occurred in essentially all areas, and showed the highest YFV infection rates (minimum infection rate [MIR] = 32.5, maximum likelihood estimate [MLE] = 32.1; MIR = 54.1, MLE = 35.8, respectively). *Sabethes chloropterus*, *Sa. soperi*, *Sa. identicus*, *Aedes aureolineatus*, and *Shannoniana fluviatilis* were also found to be naturally infected and may have a secondary role in transmission. This is the first report confirming the infection of *Sa. identicus*, *Ae. aureolineatus*, and *Sh. fluviatilis* with the YFV. Our study emphasizes the importance of maintaining high vaccination coverage in receptive areas to YFV transmission, the urgency of entomological surveillance actions in the Atlantic Forest, as well as the need for combined interventions, integrating the human host, arthropod vectors and non-human primates aiming to reduce the morbidity and mortality of sylvatic yellow fever in Brazil.

Keywords: Yellow Fever; Culicidae; Vectors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Febre Amarela.....	22
2.2 Etiologia.....	22
2.3 Aspectos clínicos.....	24
2.4 Diagnóstico.....	24
2.5 Tratamento, prevenção e controle.....	25
2.6 Aspectos históricos da era pré-vacina.....	27
2.7 Aspectos ecológicos e epidemiológicos da febre amarela	32
2.8 Hospedeiros vertebrados	34
2.9 Hospedeiros invertebrados no Brasil.....	36
2.10 Surto recente de febre amarela no Espírito Santo, Brasil, 2017	40
3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo geral	46
4.2 Objetivos específicos	46
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1 Declaração de ética.....	47
5.2 Área de estudo	47
5.3 Cronologia do levantamento entomológico	52
5.4 Levantamento Entomológico	54
5.4.1 Amostragem de adultos 1	54
5.4.2 Amostragem de adultos 2	55
5.4.3 Amostragem de imaturos.....	56
5.5 Caracterização Taxonômica.....	59
5.6 Detecção de YFV	60
5.7 Análise de dados.....	62
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES	92
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXO A – Licença para coleta de material zoológico.....	107

1 INTRODUÇÃO

A partir de dezembro de 2016, o Brasil apresentou uma expressiva ascensão da atividade do vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* - YFV) com a detecção de epizootias e infecções humanas, na região Sudeste, em áreas costeiras de Mata Atlântica, bioma onde a transmissão silvestre foi descoberta pela primeira vez, no estado do Espírito Santo (SOPER *et al.*, 1933), mas no qual, não se registrava a ocorrência da doença há quase oito décadas e onde a vacinação não era, até então, recomendada (BRASIL, 2017a; POSSAS *et al.*, 2018).

O surto que veio a se tornar o mais grave da história recente da febre amarela, com rápida disseminação da doença, foi detectado inicialmente na porção oriental do estado de Minas Gerais, atingindo o estado do Espírito Santo alguns dias depois, em janeiro de 2017, a partir do oeste, pelas bacias do rio Itapemirim e do rio Doce (ABREU *et al.*, 2019; DELATORRE *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2017; MOUSSALLEM *et al.*, 2019). Todos os estados da região Sudeste foram atingidos no mesmo ano, situação que persistiu até 2019.

O impacto dessa transmissão silvestre na região Sudeste do Brasil foi inédito tanto nas populações humanas quanto nas populações de macacos resultando em mais de 1.600 epizootias e 1.900 casos humanos, com 593 óbitos confirmados até abril de 2018 (ABREU *et al.*, 2019; BRASIL, 2017b; MOUSSALLEM *et al.*, 2019; REZENDE *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Em 2019, após os surtos relatados em São Paulo, o vírus se disseminou em direção à região Sul do país alcançando os estados do Paraná e de Santa Catarina naquele ano e em 2020 (BRASIL, 2019, 2020; DELATORRE *et al.*, 2019). Nessas regiões, os surtos de YFV foram de menor magnitude quando comparados àqueles dos anos anteriores. Contudo, essas áreas não registravam a circulação do vírus há décadas e a recomendação de vacinação para as populações havia sido adotada recentemente em relação ao período do surto (BRASIL, 2020).

A maior incidência de febre amarela no surto em questão ocorreu no estado do Espírito Santo, ocorrendo a maioria dos casos na região montanhosa, representados especialmente por indivíduos com ocupações relacionadas à floresta (BRASIL, 2019;

MOUSSALLEM *et al.*, 2019). Dos 78 municípios do estado, 34 foram afetados com 196 epizootias, 179 infecções humanas confirmadas laboratorialmente e 58 mortes registradas entre janeiro e maio de 2017 (SIQUEIRA *et al.*, 2021).

O desconhecimento sobre a dinâmica do ciclo silvestre da febre amarela nessas áreas, consideradas livres da circulação do vírus, impediu uma avaliação adequada da força de transmissão viral nas florestas, da disseminação epizootica e da detecção das áreas que seriam afetadas. Órgãos brasileiros de vigilância epidemiológica recomendaram a investigação entomológica como estratégia importante para fortalecer a vigilância da doença, de forma a ampliar as informações disponíveis para compreensão, intervenção e resposta dos serviços de saúde, bem como para contribuir para o conhecimento e o monitoramento das características epidemiológicas relacionadas à transmissão no Brasil (BRASIL, 2017a).

Consoante com essa orientação e quando se anunciava a chegada da febre amarela ao estado do Espírito Santo, em janeiro de 2017, o grupo de pesquisa da Unidade de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Espírito Santo, reconhecia a necessidade de ações rápidas para a investigação da epidemiologia da transmissão silvestre no estado, por meio do levantamento entomológico das espécies transmissoras em diferentes áreas florestais, bem como da detecção de espécies infectadas naturalmente pelo YFV.

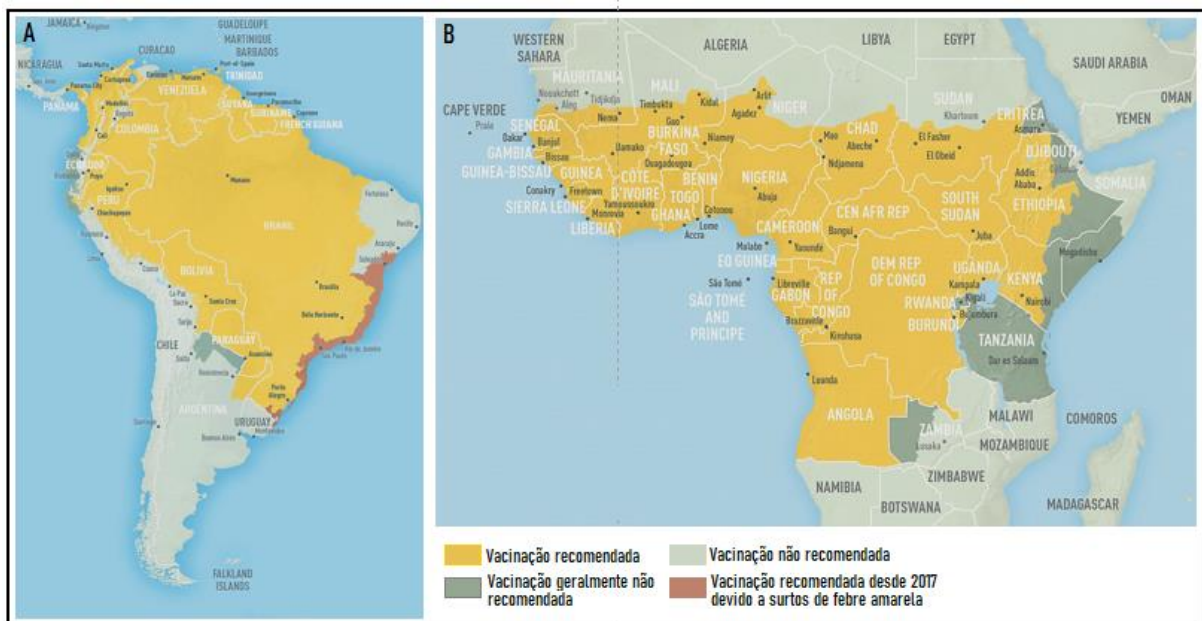
Nesse estudo, conduziu-se uma investigação entomológica de Culicidae no Espírito Santo, que teve início em fevereiro de 2017, durante o ápice da epidemia de febre amarela no estado (que foi de janeiro a fevereiro de 2017), e que se estendeu após esse ápice, por quatro meses, de março a abril de 2017. Seis áreas florestais, localizadas em quatro municípios foram definidas para amostragem por serem áreas com notificações de epizootias e de casos humanos, assim como por estarem localizadas em bacias hidrográficas e microrregiões distintas, com diferentes altitudes e características ambientais. A região do município de Santa Teresa, onde a transmissão da febre amarela sem a presença de *Ae. aegypti* foi detectada pela primeira vez por Soper *et al.* (1933), também foi incluída no estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Febre Amarela

A febre amarela é uma doença hemorrágica viral aguda que acomete humanos e primatas não humanos (PNH) predominantemente em regiões de florestas tropicais ou sub-tropicais da África e da América Latina, sendo 40 países considerados endêmicos e de alto risco para surtos (Figura 1) (CDC, 2019). A febre amarela tem o potencial de se espalhar rapidamente e causar sérios impactos à saúde pública sendo considerada reemergente nos últimos anos, em áreas não endêmicas no Brasil (LINDSEY *et al.*, 2022; BICCA-MARQUES *et al.*, 2022; MONATH; VASCONCELOS, 2015; MORENO *et al.*, 2011; POSSAS *et al.*, 2018; VASCONCELOS, 2010).

Figura 1 – Mapa das áreas com risco de transmissão do YFV no mundo.



(A) na América do Sul e na América Central e (B) na África¹. Fonte: CDC (2019).

¹Estes mapas foram atualizados em 2018 a partir do mapa criado em 2010 pelo Grupo de Trabalho Informal da OMS sobre o Risco Geográfico da febre amarela.

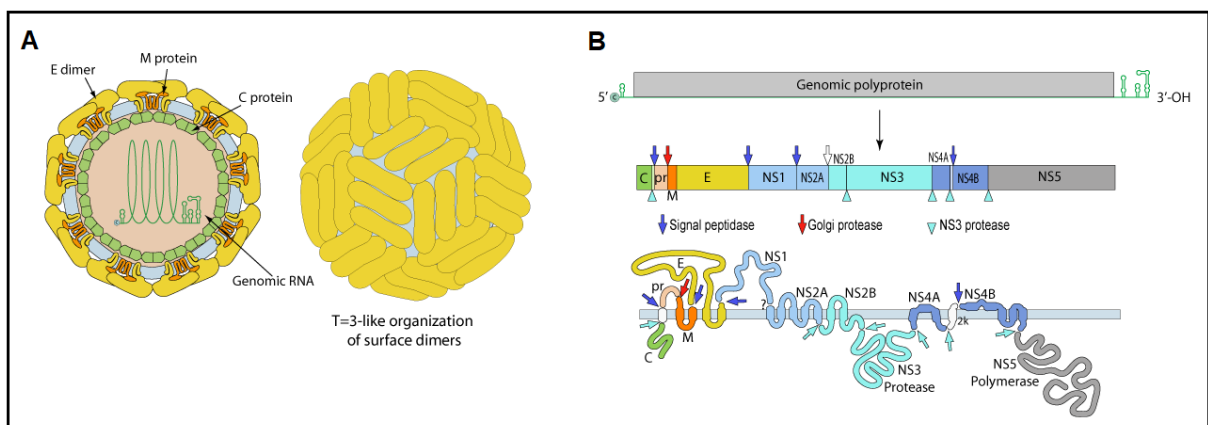
2.2 Etiologia

O vírus da febre amarela ou vírus amarílico (*Yellow fever virus* - YFV), é um arbovírus (*arthropod borne virus*), ou seja, um agente cuja transmissão se dá por vetores artrópodes. Os principais vetores são insetos popularmente conhecidos como mosquitos (Diptera, Culicidae), em especial espécies dos gêneros *Aedes*,

Haemagogus e *Sabethes*, cuja transmissão ocorre pela picada de fêmeas infectadas (ABREU *et al.*, 2019; HANLEY *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2003).

O YFV é uma espécie classificada ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, assim como outros vírus de importância médica como *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *West Nile virus* (WNV), *Rocio virus* (ROCV) e *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV). Trata-se de um vírus envelopado, com aproximadamente 40-50nm de diâmetro, cujo envelope bilaminar lipoproteico é originário da célula hospedeira. O nucleocapsídeo mede cerca de 25-40nm (Figura 2). Seu genoma é de RNA de fita simples não segmentado, com polaridade positiva, constituído por aproximadamente 11.000 nucleotídeos que codificam dez proteínas virais: três proteínas estruturais do capsídeo (C), proteína pré-membrana (PrM), e proteína do envelope (E), além de sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (CHAMBERS *et al.*, 1990; NUNES *et al.*, 2012). Até agora, sete genótipos do vírus foram descritos, sendo: cinco na África, denominados África Ocidental I, África Ocidental II, África Oriental, África Oriental/Central e Angola e dois na América do Sul, denominados Sul-Americano I e Sul-Americano II, com o primeiro representando o maior número de registros no Brasil (DELATORRE *et al.*, 2019; MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Figura 2 - Desenho esquemático da estrutura do YFV.

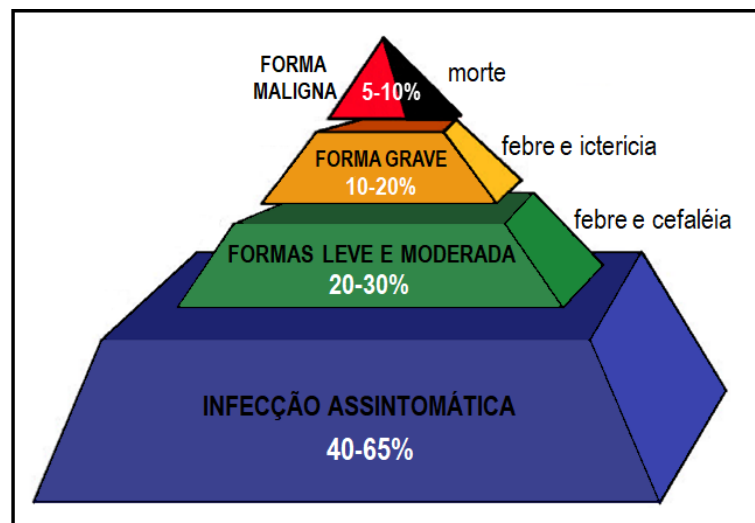


(A): Estrutura do vírion apresentando as proteínas estruturais C (capsídeo), M (membrana) e E (envelope). (B): Estrutura do genoma de RNA de fita simples não segmentado, com polaridade positiva, e da poliproteína que codifica três proteínas estruturais (C, M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4a, NS4b e NS5). Fonte: VIRALZONE (2023).

2.3 Aspectos clínicos

As manifestações clínicas da infecção em humanos e PNH variam desde doença leve não específica como febre, dor de cabeça, dores musculares, náuseas, vômitos e fadiga, até doença grave e maligna incluindo, icterícia (sinal característico da forma grave da infecção e que deu nome à doença), hemorragia, falha múltipla de órgãos e choque (GOLDANI, 2017; MONATH; VASCONCELOS, 2015). Aproximadamente 55% dos indivíduos com YFV são assintomáticos, 26% apresentam sintomas leves e 19% apresentam sinais e sintomas graves, podendo evoluir para a morte (JOHANSSON; VASCONCELOS; STAPLES, 2014; MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2003). A letalidade entre os casos graves pode chegar a 50% (Figura 3) (VASCONCELOS, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número estimado de casos graves na África e na América do Sul é de 84.000 a 170.000, com aproximadamente 29.000 a 60.000 mortes anualmente (WHO, 2019).

Figura 3 - Esquema gráfico da distribuição das formas clínicas da febre amarela.



Fonte: VASCONCELOS (2003).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da febre amarela é primeiramente baseado nas características clínicas, nas atividades realizadas pelo paciente e na história epidemiológica do lugar onde possivelmente ocorreu a infecção. Contudo, a confirmação dos casos requer análises laboratoriais. A confirmação laboratorial da febre amarela é realizada por métodos

viroológicos (diagnóstico molecular, isolamento viral e imunohistoquímica) e sorológicos (ELISA, PRNT). O estudo histopatológico com imunohistoquímica em cortes de fígado e outros tecidos coletados de humanos ou PNH *post-mortem* é o método “padrão ouro” para o diagnóstico da febre amarela em casos fatais. Os métodos moleculares a partir de amostras de tecido fresco ou fígado em formaldeído (embebidos em parafina) também podem ser utilizados complementarmente para a confirmação de casos fatais (OPAS, 2018; FUNASA, 1999).

2.5 Tratamento, prevenção e controle

Até a presente data, não existem medicamentos antivirais específicos para a febre amarela, sendo o tratamento feito com base em cuidados de suporte ao paciente. A medida mais importante de prevenção contra a febre amarela é a vacinação. No Brasil, a vacina antiamarílica é produzida desde 1937, primeiramente pelo Instituto Oswaldo Cruz e posteriormente, pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos. Ela é constituída por vírus atenuados da linhagem 17D (sub-cepa 17DD) derivados de uma amostra africana do vírus selvagem (BRASIL, 2009a). A vacina é eficaz e segura e a imunidade é alcançada em dez dias, pelo menos para 80% dos indivíduos vacinados, e em 30 dias, para 99% dos indivíduos vacinados (MONATH; VASCONCELOS, 2015; PAHO, 2022).

Até 2016, a revacinação a cada dez anos era recomendada pelos órgãos competentes, embora estudos sorológicos em populações vacinadas uma única vez e vivendo fora da área de risco, já demonstrassem índices neutralizantes por várias décadas, sugerindo que uma única vacinação confere imunidade de longa duração, talvez por toda a vida. A partir de abril de 2017, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde, o Brasil passou a adotar o esquema vacinal de apenas uma dose durante toda a vida, sendo que para a pessoa que recebeu uma dose da vacina antes de completar cinco anos de idade, está indicada uma dose de reforço (PAHO, 2022; BRASIL, 2022; VASCONCELOS, 2003).

Apesar da disponibilidade de vacinas seguras e eficazes desde a década de 1930, os surtos de YFV continuam a ocorrer, resultando em milhares de mortes anualmente. A maioria dos casos leves de febre amarela não é detectada devido a sintomas

inespecíficos e às limitações em algumas áreas de risco decorrentes de falhas na vigilância ou de incapacidade de diagnóstico laboratorial. Em razão da natureza enzoótica e perene da circulação viral nas florestas tropicais, como na região Amazônica do Brasil, onde se concentram as maiores florestas do país e, conseqüentemente, onde é maior o número de hospedeiros vertebrados e invertebrados, a doença é de difícil erradicação (POSSAS *et al.*, 2018; VASCONCELOS, 2003).

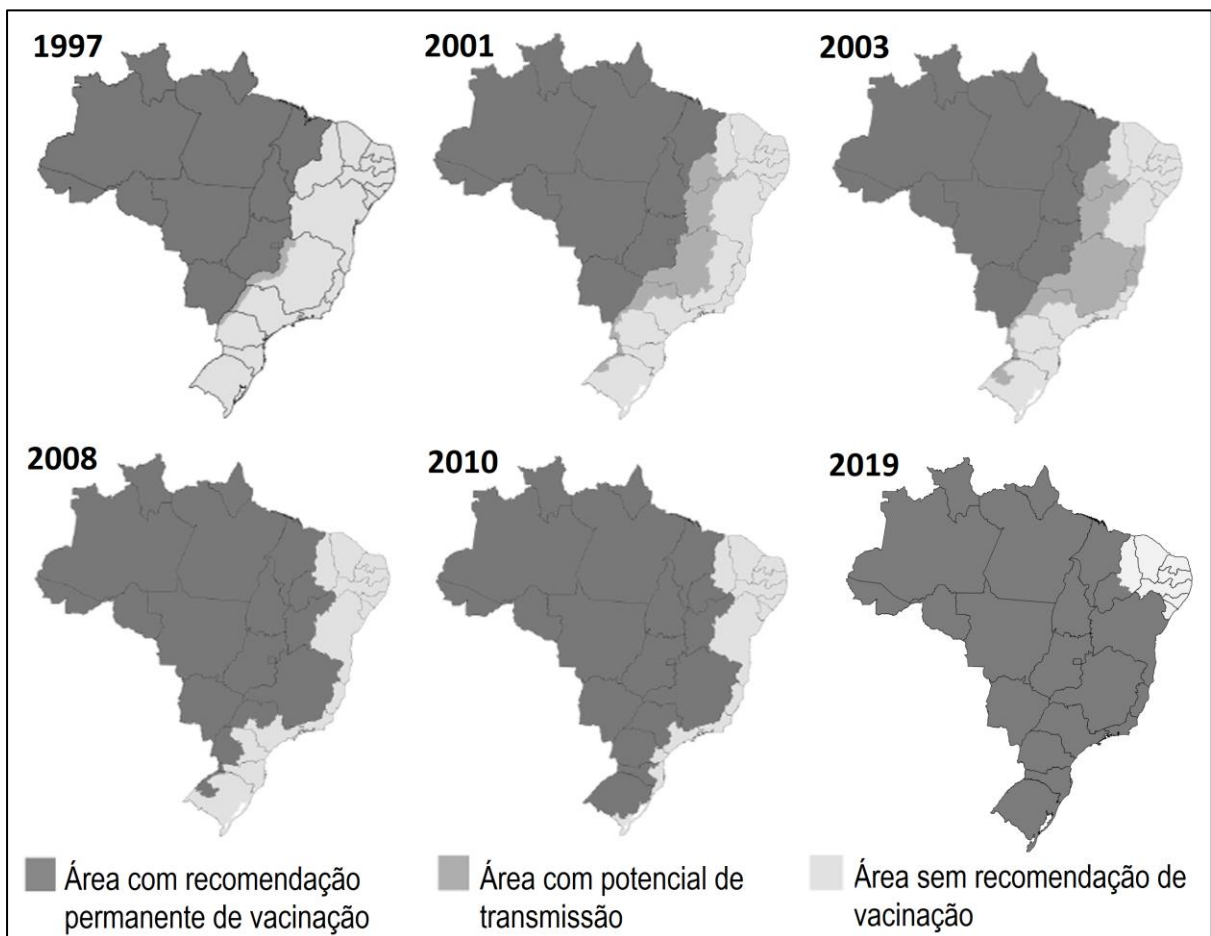
Os grupos de humanos mais acometidos são constituídos por indivíduos que realizam atividades laborais agropecuárias ou florestais, por populações de áreas não endêmicas com expansão do vírus, em função da menor cobertura vacinal ou recomendação vacinal recente, bem como por ecoturistas que adentram nas matas sem vacinação prévia (HAMLET *et al.*, 2021; ROMANO *et al.*, 2014; VASCONCELOS, 2003).

No Brasil, a vacinação era originalmente recomendada para populações humanas residentes ou visitantes em áreas endêmicas das regiões Norte e Centro-Oeste, e na parte pré-Amazônica do Maranhão. A partir de 2008, devido ao avanço de casos de febre amarela para outras regiões e biomas do país, carreados por mosquitos, por PNH e, ocasionalmente, por humanos, as áreas de risco e de recomendação de vacina passaram a ser avaliadas e definidas anualmente pelo Ministério da Saúde (Figura 4) (ARAÚJO *et al.*, 2011; BRASIL, 2017b; VASCONCELOS, 2010).

Apesar da expansão gradual das áreas de recomendação da vacina, até 2016, a zona costeira do Brasil ficou de fora das áreas prioritárias, estando excluídos do programa os estados Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em 2017, após a reemergência do YFV em áreas de Mata Atlântica da região Sudeste, houve nova expansão da recomendação de vacinação para as áreas litorâneas. Até 2019, estava fora das áreas de recomendação de vacina pelo Ministério da Saúde a costa da região Nordeste, do Piauí até Sergipe, sendo ampliada a recomendação da vacina para todo o território nacional a partir de 2020 (ABREU, 2019; MS, 2020; ROMANO *et al.*, 2014).

Recentemente, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) publicou relatório de alerta epidemiológico incentivando os países com áreas de risco para febre amarela a continuarem seus esforços para fortalecer a vigilância em áreas endêmicas, imunizar a população de risco e manter reserva de vacinas (PAHO, 2022).

Figura 4 - Expansão gradual das áreas de recomendação de vacina contra a febre amarela no Brasil, preconizadas pelo ministério da saúde.



Fonte: ROMANO *et al.* (2014); ABREU (2019); MS (2020).

2.6 Aspectos históricos da era pré-vacina

Somente depois da chegada dos europeus às Américas é que a febre amarela passou a figurar nos estudos das doenças. A partir do século XVII, surtos reconhecidamente de febre amarela assolaram as cidades da América do Sul, da América Central, da América do Norte, da Europa e da África. Embora haja a descrição de uma epidemia ocorrida em Guadalupe em 1635, entre imigrantes franceses, o primeiro surto possível

de identificar-se com segurança como sendo febre amarela, ocorreu em Yucatán, México, em 1648, sendo ambos os relatos característicos da forma silvestre da doença (GARDNER; RYMAN, 2010; FRANCO, 1969; VAINIO; CUTTS, 1998).

Evidências filogenéticas e epidemiológicas apontam para a origem do YFV na África há mais de 1.000 anos (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; MONATH; VASCONCELOS, 2015). Sua introdução nas Américas, provavelmente a partir do comércio de pessoas escravizadas e de mercadorias, no século XVI, desencadeou uma dramática reação em cadeia de surtos em todo o continente entre os séculos XVII e XVIII (PATTERSON, 1992; WHITE, 2018). Os genótipos americanos, são monofiléticos e filogeneticamente próximos aos genótipos do oeste da África, dos quais divergiram há aproximadamente 470 anos. Após a chegada na América, eles divergiram entre si, há cerca de 300 anos, dando origem aos genótipos Sul-Americano I (o mais amplamente distribuído no continente americano e essencialmente o único encontrado nos isolados brasileiros) e Sul Americano II (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

Os navios europeus que faziam viagens entre a África e a América traziam água armazenada em barris, que serviriam de criadouros para o mosquito africano *Aedes aegypti*, à época *Stegomyia fasciata*, além de trazerem humanos, muitas vezes infectados. Isto contribuiu para o aparecimento de muitos surtos, em muitas cidades portuárias americanas de clima temperado, tropical e subtropical, entre os séculos XVII e XIX, ceifando milhares de vidas (FRANCO, 1969).

No continente Africano, os registros de febre amarela constam desde 1664, atingindo vários países, principalmente da África Ocidental. Na Europa, entre 1649 e 1878, ocorreram surtos em cidades da Espanha, de Portugal, da Itália, da Irlanda, da Inglaterra e da França, sendo que, em Barcelona (Espanha), em 1821, ocorreram entre 5.000 e 20.000 mortes (VAINIO; CUTTS, 1998). Na América do Norte, entre 1668 e 1898 houve vários surtos (pelo menos 25), alguns devastadores, em cidades como Nova York, Filadélfia, Memphis, Charleston, Nova Orleans (com 4.000 mortes) e Jackson (Mississippi) (com 20.000 mortes). O último surto na América do Norte ocorreu em Nova Orleans em 1905. As perdas econômicas foram da ordem de milhões de dólares (BARRETT; HIGGS, 2007; VAINIO; CUTTS, 1998). Nas Américas do Sul e Central, foram registrados surtos, desde 1648, em diversos países, como

México, Colômbia, Chile, Guiana Francesa, Venezuela e Brasil (BARRETT; HIGGS, 2007; VAINIO; CUTTS, 1998).

No Brasil, entre 1685 e 1900, foram registrados diversos surtos de YFV em grandes cidades litorâneas, como Recife, Salvador e Rio de Janeiro, causando pânico entre os habitantes e, sobretudo os imigrantes, e prejudicando as rotas comerciais (FRANCO, 1969). Durante o século XIX até quase meados do século XX, a febre amarela foi o maior problema de saúde pública do país.

Durante todo este período, tanto a etiologia quanto o modo de transmissão da doença eram desconhecidos, o que dificultava o controle e a profilaxia. Uma das hipóteses correntes da época era que a infecção se dava por gases tóxicos exalados por plantas e animais em decomposição (“miasmas” ambientais), o que levou ao estabelecimento de diversas providências de saneamento não eficazes contra a doença (FRANCO, 1969).

Essas epidemias devastadoras de febre amarela amplamente distribuídas nos séculos XVII, XVIII e XIX exigiram que médicos e cientistas dedicassem sua atenção a responder a perguntas sobre o que causava a doença, como era transmitida e quais medidas poderiam ser tomadas para reduzir a morbimortalidade. Isso forneceu um impulso importante para o desenvolvimento da entomologia médica. A investigação de cada uma dessas questões resultou em uma melhor compreensão das doenças transmitidas por vetores, no desenvolvimento de técnicas científicas para esses estudos e na implementação do controle de vetores como um componente de programas de saúde pública de grande escala (BARRETT; HIGGS, 2007).

Durante muito tempo, investigadores vinham notando, em países atingidos por epidemias amarílicas, que havia alguma associação entre surtos infecciosos e mosquitos. O primeiro pesquisador a sugerir que a transmissão da febre amarela se dava aos humanos por intermédio de insetos foi Nott, em 1848, nos Estados Unidos da América (EUA), refutando a hipótese dos miasmas (NOTT, 1848; FRANCO, 1969).

Foi Carlos Finlay, um cientista cubano, quem primeiro determinou, em 1886, que os mosquitos eram os responsáveis pela disseminação da doença transferindo patógenos do sangue de um hospedeiro doente para um saudável. Ele mesmo também suspeitou, de maneira inédita, do papel do mosquito, hoje conhecido como

Ae. aegypti, na transmissão da febre amarela urbana (CLEMENTS; HARBACH, 2017). Sua hipótese foi definitivamente provada em 1900, por Walter Reed e colaboradores, enviados pelo governo dos EUA para Cuba que concluíram que o mosquito *Ae. aegypti* era envolvido na transmissão da febre amarela aos humanos. Este mesmo grupo de estudiosos demonstrou, em estudos virológicos inovadores, que a doença era causada por um agente que podia ser filtrado do sangue de indivíduos infectados.

Essas descobertas sobre a transmissão da febre amarela subsidiaram medidas de amplo combate e prevenção da doença baseadas no combate a esse vetor (CLEMENTS; HARBACH, 2017; REED; CARROLL; AGRAMONTE, 1900). Diversas cidades e países, incluindo o Brasil, obtiveram sucesso na erradicação do *Ae. aegypti*, o que fez com que se acreditasse que a erradicação global da febre amarela seria possível (SOPER, 1963).

No entanto, a tese de que *Ae. aegypti* era o único vetor da febre amarela foi contrariada em 1932, quando Soper *et al.* (1933) notificaram, pela primeira vez, casos de febre amarela “sem *Ae. aegypti*” na região do Vale do Canaã, no Espírito Santo. Após longos levantamentos entomológicos, não foi encontrada a presença do vetor urbano nas localidades com casos de febre amarela confirmados clínica e experimentalmente (SOPER *et al.*, 1933).

Esses resultados inéditos sobre a existência de um ciclo silvestre de febre amarela, envolvendo outros vetores haviam primeiramente sido sugeridos por Adolpho Lutz, em 1898 (LUTZ, 1930) e foram então, confirmados por Soper e colaboradores em 1932. A descoberta da manutenção da circulação do YFV nas florestas entre mosquitos e macacos, abalou as expectativas de erradicação da doença no Brasil. Esses achados deram início a intensas pesquisas sobre a transmissão silvestre da febre amarela no Brasil e na África. Estudos multidisciplinares intensos em florestas foram realizados envolvendo levantamentos entomológicos, instalação de animais sentinelas e infecções experimentais. Os resultados permitiram caracterizar os principais vetores e hospedeiros amplificadores do YFV nos dois continentes, além de possibilitarem o isolamento e a caracterização do YFV. Nessa época, os mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* foram reconhecidos como os principais vetores silvestres na América, sendo os macacos dos gêneros *Alouatta* e *Cebus/Sapajus* os principais hospedeiros silvestres (BUGHER *et al.*, 1944; LAEMMERT; HUGHES;

CAUSEY, 1949; SHANNON; WHITMAN; FRANCA, 1938; SOPER, 1938; STRODE, 1951).

Paralelamente, esforços laboratoriais para se estudar o patógeno também avançavam. Em 1915, uma comissão americana da Fundação Rockefeller, fez parte de um grande esforço científico para identificar a causa da febre amarela (FRIERSON, 2010). Em 1927, na África Ocidental Francesa, Stokes, Bauer e Hudson, da Fundação Rockefeller, conseguiram transmitir a febre amarela a um macaco (Rhesus) usando o sangue de um paciente chamado Asibi, de 28 anos, com febre amarela (STOKES; BAUER; HUDSON, 1928). O isolamento da cepa Asibi por sucessivas passagens de macaco a macaco ou pela cadeia macaco-mosquito-macaco foi um importante marco no estudo da febre amarela e no desenvolvimento da vacina (STRODE, 1951). Esforços sucessivos demonstraram que diversos gêneros de primatas neotropicais (Ex: *Cebus/Sapajus*, *Alouatta* e *Callithrix*) também eram susceptíveis ao YFV (DAVIS, 1930a, 1930b, 1930c).

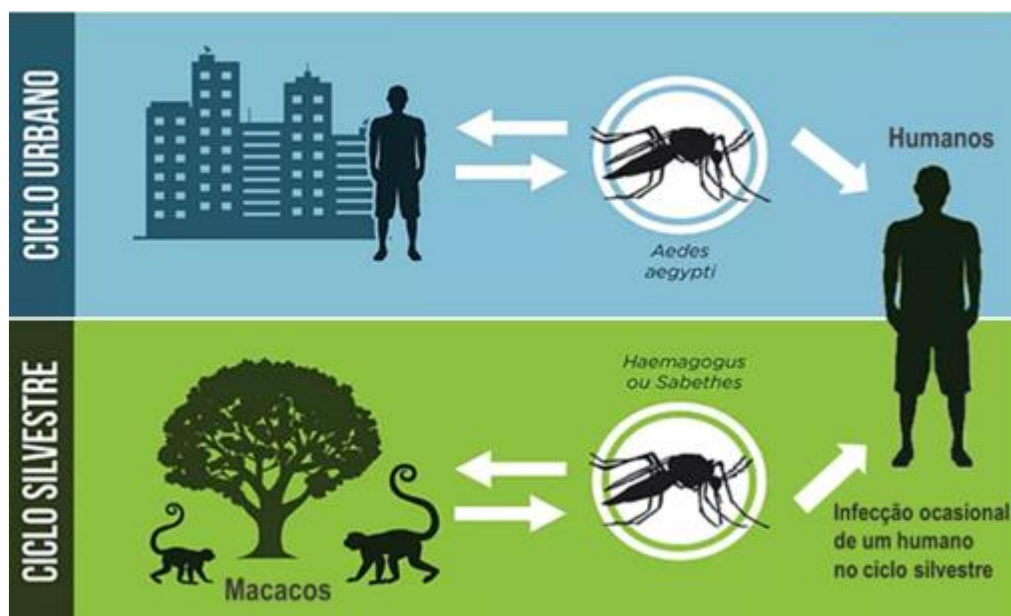
Duas vacinas de vírus atenuados contra febre amarela foram desenvolvidas na década de 1930 a partir da cepa Asibi: a vacina neurotrópica francesa de vírus humano transmitido em cérebro de camundongo (que foi descontinuada por volta de 1980) e a vacina 17D de vírus humano transmitido em ovos de galinha embrionados (BARRETT; HIGGS, 2007; VAINIO; CUTTS, 1998).

Em 1916, a Fundação Rockefeller instalou-se no Rio de Janeiro com o objetivo de promover pesquisas científicas e ações de profilaxia das principais doenças endêmicas do país. A vacina 17D foi desenvolvida em 1936, quando membros da Fundação Rockefeller observaram que as afinidades viscerotrópicas e neurotrópicas do vírus atenuado eram grandemente reduzidas, após repetidas passagens da linhagem 17D, feitas *in vitro*, empregando embrião de galinha desprovido do sistema nervoso central, mas, conservava-se as propriedades imunizantes. Posteriormente, a técnica de produção da vacina 17D foi aperfeiçoada e ela vem sendo produzida e empregada no Brasil desde 1937 (FRANCO, 1969).

2.7 Aspectos ecológicos e epidemiológicos da febre amarela

Atualmente, está esclarecido que a febre amarela possui dois ciclos epidemiológicos essenciais de transmissão no Brasil, o urbano e o silvestre (Figura 5). Dos pontos de vista etiológico, clínico, imunológico e fisiopatológico, a doença é a mesma nos dois ciclos, os quais diferem quanto ao hospedeiro, aos transmissores e ao local de ocorrência.

Figura 5 - Ciclos epidemiológicos da febre amarela no Brasil.



Fonte: BRASIL (2017c).

No ciclo urbano, o hospedeiro é o homem, não se reconhecendo reservatórios animais de importância epidemiológica. Nele, *Ae. aegypti* é o principal vetor, tanto na África como na América do Sul. No Brasil, o último relato de transmissão urbana ocorreu no Acre em 1942. A partir dessa data, a transmissão silvestre foi a única identificada no país (DÉGALLIER *et al.*, 1986; HERVÉ *et al.*, 1986). Existe evidência sorológica de um pequeno surto urbano ocorrido em Santa Cruz, Bolívia, em 1999 e surtos urbanos ainda são relatados na África, predominantemente na Nigéria, um país com grande população urbana (VAN DER STUYFT *et al.*, 1999).

No ciclo silvestre a febre amarela é uma zoonose, cujos hospedeiros são PNH e mosquitos silvestres, que mantêm o vírus nas florestas tropicais e subtropicais da África e da América, causando periodicamente surtos isolados ou epidemias em

humanos não imunizados, quando eles adentram ou se aproximam dessas áreas (MONATH, 2001). No Brasil, os gêneros *Allouata* e *Callithrix* incluem os principais PNH hospedeiros amplificadores do YFV (ARAÚJO *et al.*, 2011; BRASIL, 2017c; GONTIJO, 2019; MARES-GUIA *et al.*, 2020). Nesse ciclo, a transmissão se dá por meio de mosquitos de hábitos silvestres, dentre os quais os gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Desde que sua competência vetorial se tornou conhecida, espécies desses gêneros continuam sendo consideradas como vetores nas áreas florestais das Américas (VASCONCELOS, 2003; BRASIL, 2009a; ABREU *et al.*, 2019).

O ciclo de transmissão silvestre é perene na floresta tropical do norte da América do Sul, particularmente na Amazônia, a partir da qual o YFV pode iniciar ondas epizooticas de expansão seguidas de retrações, afetando outros biomas e ameaçando populações de PNH em risco de extinção. No transcurso dessas epizootias, também são afetados humanos que vivem na borda de florestas ou que as visitam para lazer ou trabalho (POSSAS *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2001a; VASCONCELOS, 2010).

Além dos ciclos silvestre e urbano, um ciclo intermediário ou de savana foi reconhecido na África resultando em epidemias de pequena escala nas aldeias rurais onde há alguma atividade humana. Esta área foi denominada zona de emergência porque provavelmente reflete o mecanismo pelo qual a febre amarela evoluiu do ciclo silvestre para se tornar uma importante doença humana. Neste ciclo, estão incluídas entre os vetores várias espécies do gênero *Aedes* presentes no continente africano (GERMAIN *et al.*, 1980).

Embora diferentes espécies de mosquitos possam ter preferências específicas de fonte alimentar, aqueles que se alimentam do sangue de primatas não humanos, geralmente, se alimentam também do sangue de humanos quando é oportuno. Conseqüentemente, a transmissão do YFV entre PNH e humanos pode exigir apenas que as pessoas adentrem em uma floresta com circulação viral (MUTEBI; BARRETT, 2002).

Na relação vírus e hospedeiro invertebrado, é imprescindível que eles sejam compatíveis e que o mosquito seja um vetor competente. Essa competência é determinada por diversos fatores que atuam basicamente por meio da permissividade

do vetor para que o vírus consiga avançar por todas as etapas de infecção. O mosquito deve fazer seu repasto no sangue de um hospedeiro virêmico, uma quantidade mínima de partículas virais capaz de causar infecção deve alcançar o intestino médio do inseto, os vírions devem se ligar à superfície intestinal, penetrar e se multiplicar nas células epiteliais, eles devem se disseminar das células epiteliais para a hemocele, devem alcançar e infectar as glândulas salivares e, por fim, devem ser secretados na saliva do mosquito quando ele for fazer o repasto no sangue de um novo hospedeiro. Essas etapas podem ser influenciadas por fatores vetoriais, virais e ambientais (HARDY *et al.*, 1983; HIGGS, 2004; KRAMER; EBEL, 2003).

2.8 Hospedeiros vertebrados

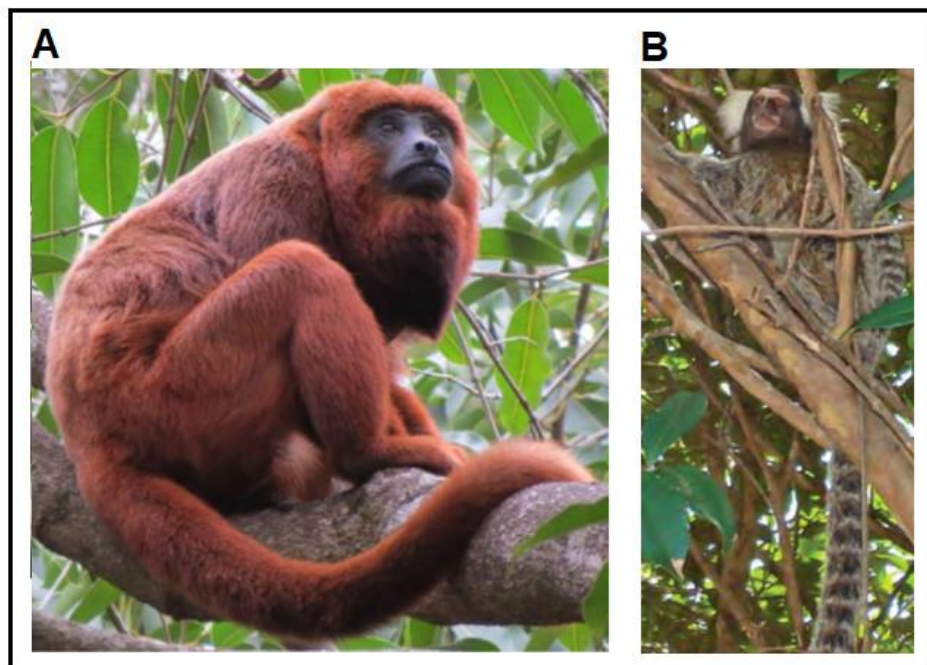
Os primatas são comprovadamente implicados como hospedeiros nos ciclos de transmissão do YFV. O ciclo silvestre de transmissão envolve PNH que, quando infectados, morrem ou desenvolvem imunidade protetora ao longo da vida (BARRETT; MONATH, 2003).

No continente africano, embora os PNH sejam suscetíveis ao YFV e se tornem virêmicos, parecem ser mais resistentes à infecção, e raramente são ameaçados pela doença. Isso pode permitir a manutenção da população de PNH e a circulação de YFV na área, encurtando os períodos entre epidemias (BARRETT; MONATH, 2003; BRÈS, 1986). *Colobus abyssinicus* é a principal espécie de PNH hospedeira para o YFV na África Oriental e Central, enquanto *Cercopithecus* spp. são hospedeiros em várias áreas de floresta e savana em toda a África (BARRETT; MONATH, 2003). Distintivamente, os PNH neotropicais (macacos do Novo mundo) são amplamente suscetíveis à infecção pelo YFV. De fato, todos os gêneros testados experimentalmente tornaram-se infectados após a inoculação do vírus (BRASIL, 2005; STRODE, 1951).

No Brasil, os gêneros *Ateles* (macacos-aranha), *Saimiri* (macacos-de-cheiro), *Cebus* e *Sapajus* (macacos-pregos) e *Callicebus* (sauás ou guigós) são tidos como mais resistentes (BRASIL, 2005; LAEMMERT; KUMM, 1950). Os gêneros considerados mais sensíveis ao YFV são os *Aotus* (macacos-da-noite) que, devido aos seus hábitos noturnos, têm exposição limitada ao vírus, os *Saguinus* e os *Callithrix* (micos e saguis) e os *Alouatta* (bugios ou barbados) (Figura 6). Nas populações de *Alouatta*, a infecção,

mesmo inóculos mínimos do vírus, torna-se fulminante, com grandes semelhanças com os casos humanos fatais (STRODE, 1951; VASCONCELOS, 2003). Na região Amazônica, onde a febre amarela é considerada endêmica, a doença apresenta uma dinâmica cíclica, causando surtos, com casos humanos e em PNH, em intervalos que variam entre sete e quatorze anos, tempo necessário para a renovação das populações susceptíveis de símios (CÂMARA *et al.*, 2011; HERVÉ; TRAVASSOS-DA-ROSA, 1983).

Figura 6 - Fotografias de espécimes de Primatas Não Humanos (PNH) hospedeiros amplificadores do YFV no Brasil.



(A) *Allouata* sp. (B) *Calithrix* sp. Fonte: BRASIL (2017c).

A ocorrência da febre amarela silvestre no Brasil, até 1999, estava restrita às regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil e ao estado do Maranhão (BRASIL, 2005, 2009b; POSSAS *et al.*, 2018). A partir do ano 2000, devido a ondas de expansão do YFV em áreas antes livres de sua circulação, as áreas de risco e a vigilância de epizootias foram redefinidas pelas autoridades sanitárias, exigindo-se notificação imediata (BRASIL, 2006).

2.9 Hospedeiros invertebrados no Brasil

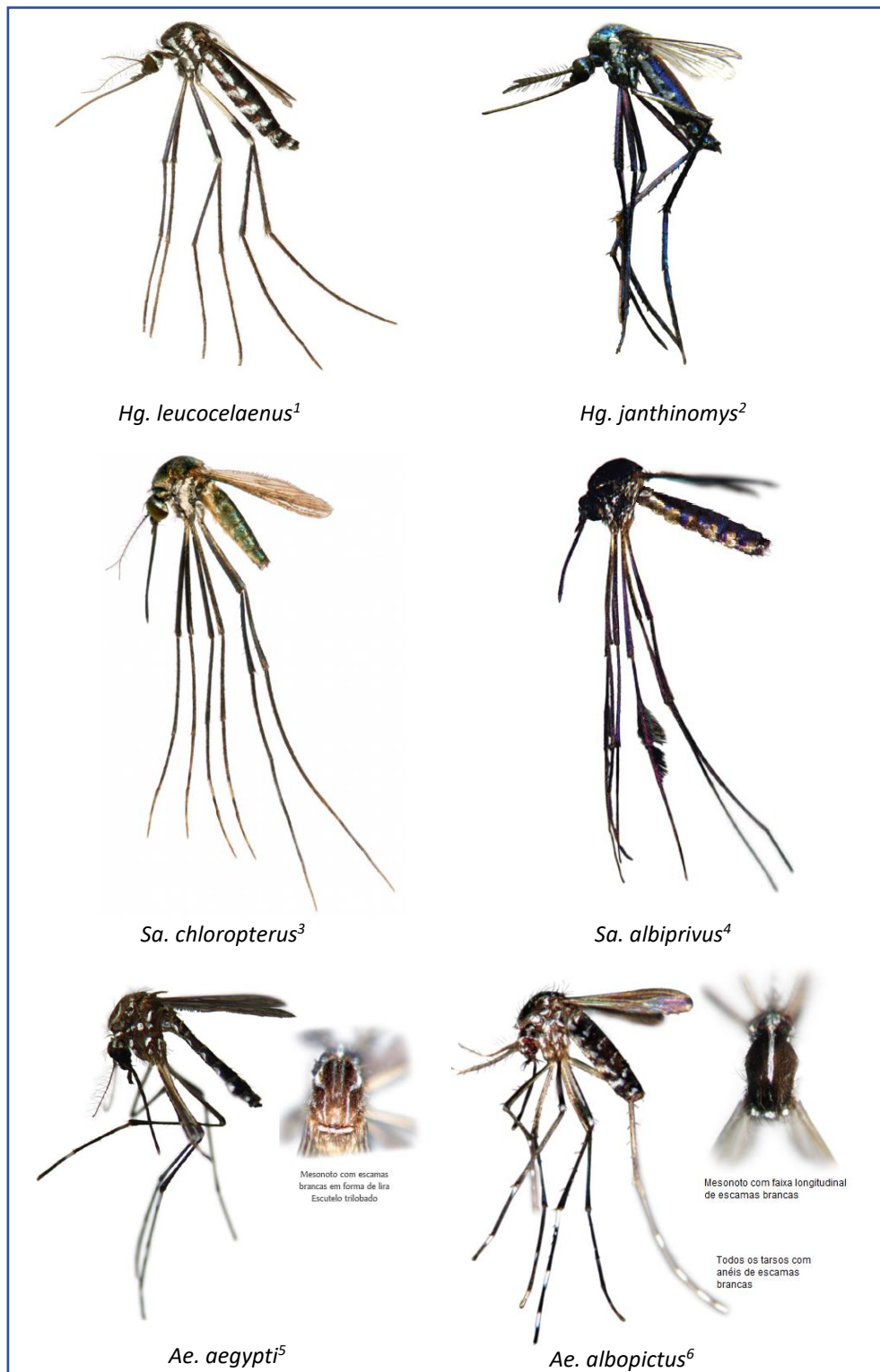
Os mosquitos, além de serem transmissores do YFV, são os reservatórios, pois, uma vez infectados, assim permanecem por toda a sua vida, ao contrário dos macacos e do homem que, ao se infectarem, morrem ou se curam e ficam imunes (VASCONCELOS, 2003). Desde a década de 1930, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* foram reconhecidos como os principais hospedeiros invertebrados silvestres do YFV no Brasil (SHANNON; WHITMAN; FRANCA, 1938) (Figura 7).

Percebia-se também que nem todo mosquito era capaz de ser infectado pelo YFV, e que nem todos os infectados eram capazes de transmiti-lo (DAVIS; SHANNON, 1929, 1930; KUMM; CERQUEIRA, 1951; WHITMAN; ANTUNES, 1937). Estudos com espécies de *Haemagogus* revelaram sua alta competência vetorial para o YFV. Mesmo quando infectados com linhagens diferentes, após um repasto sanguíneo infectante, as fêmeas susceptíveis do mosquito permanecem infectadas pelo resto da vida (COUTO-LIMA *et al.*, 2017).

Os mosquitos desse gênero pertencente à tribo Aedini da subfamília Culicinae, possuem hábitos diurnos, sendo mais ativos durante as horas mais quentes do dia. Seus criadouros preferenciais são buracos ou ocos de árvores. Seus ovos são colocados isoladamente e o ciclo reprodutivo de suas espécies é fortemente influenciado pelas chuvas e pela temperatura. São encontrados principalmente na copa das árvores das florestas tropicais embora possam apresentar tendências comportamentais variáveis de acordo com as regiões e as estações do ano (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; MARCONDES; ALENCAR, 2010).

Espécies pertencentes ao gênero *Haemagogus* são neotropicais, ou seja, encontradas na América do Sul e Central, distribuídas desde as Antilhas até o norte da Argentina. No Brasil, as espécies *Hg. janthinomys* e *Hg. leucocelaenus* são distribuídas desde a Amazônia até o sul do país, sendo que *Hg. janthinomys* tem sido encontrado com menos frequência na região Sul do que *Hg. leucocelaenus* (ARNELL, 1973; BRASIL, 2005; FORATTINI, 2002; VIRGENS *et al.*, 2018).

Figura 7 - Fotografias de mosquitos de importância para a febre amarela no Brasil.



¹*Haemagogus leucocelaenus* e ²*Hg. janthinomys* são considerados vetores silvestres primários do YFV. ³*Sabethes chloropterus* e ⁴*Sa. albiprivus* são considerados vetores silvestres secundários. ⁵*Aedes aegypti* é vetor urbano e ⁶*Ae. albopictus* é considerado potencial vetor ponte entre o ambiente silvestre e o urbano. Fonte: SEGURA; CASTRO (2007); Créditos das fotografias de *Hg. leucocelaenus* e de *Sa. chloropterus*, registradas em Ilha Grande, Angra dos Reis - RJ, 2019, ao Dr. Lawrence Reeves, *Florida Medical Entomology Laboratory* (EUA).

Os hábitos preferencialmente acrodendrófilos e primatófilos (MARCONDES; ALENCAR, 2010), a longevidade, a ampla distribuição no Brasil e a capacidade vetorial desses mosquitos, aumentam as suas chances de entrar em contato com o YFV e transmiti-lo a outro hospedeiro durante os repastos sanguíneos, posto que os PNH são os principais amplificadores vertebrados do vírus (LAEMMERT; FERREIRA; TAYLOR, 1946).

Espécies de *Haemagogus*, como *Hg. leucocelaenus*, *Hg. capricornii*, *Hg. equinus*, *Hg. janthinomys*, *Hg. lucifer*, *Hg. mesodentatus* e *Hg. spegazzinii*, são importantes vetores do YFV nas Américas. Em áreas endêmicas de YFV, na Amazônia, esse vírus já foi isolado em diversas espécies tais como *Hg. albomaculatus*, *Hg. equinus* e *Hg. janthinomys*, este último, considerado vetor primário (WILKERSON; LINTON; STRICKMAN, 2021).

Existem diversos registros de *Hg. janthinomys* infectados com YFV no Brasil e em outros países americanos. Essa espécie é considerada o principal vetor de YFV nos biomas brasileiros nas últimas décadas, ou seja, na região endêmica da Amazônia, nas zonas de emergência na transição entre a Amazônia e o Cerrado, e no Cerrado (VASCONCELOS *et al.*, 1997, 2001a). Ele também havia sido reconhecido como vetor primário nas epidemias de 1930 a 1940 que ocorreram na Mata Atlântica (SHANNON; WHITMAN; FRANCA, 1938).

Desde 1938, já havia indicações da importância da espécie *Hg. leucocelaenus* na transmissão silvestre do YFV (SHANNON; WHITMAN; FRANCA, 1938). Kumm e Cerqueira também discutiram a importância dessa espécie na década de 1950 (KUMM; CERQUEIRA, 1951). Durante investigações de epidemias de YFV no interior do sul do Brasil, em 2001 e 2008, não sendo encontrado *Hg. janthinomys*, *Hg. leucocelaenus* foi considerado como tendo importante papel na transmissão, embora tenha sido apontado como vetor secundário (CARDOSO *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2003). No surto recente de YFV (2016/2018), na região Sudeste do Brasil, Abreu *et al* (2019) concluíram que *Hg. leucocelaenus* juntamente com *Hg. janthinomys* foram os principais vetores nas localidades estudadas, devido a sua distribuição e abundância nos municípios pesquisados durante o surto, bem como às taxas notáveis de infecção natural. A espécie também foi encontrada naturalmente infectada em São Paulo durante o surto de febre amarela silvestre em 2009, quando

Hg. janthinomys e *Sa. chloropterus* foram negativos na testagem (MASCHERETTI *et al.*, 2013).

Outras espécies silvestres de mosquitos da tribo Aedini como *Ae. scapularis*, *Ae. serratus*, *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. fulvus*, *Ae. albopictus*, *Psorophora albipes* e *Ps. ferox* também aparecem na literatura como tendo sido encontradas naturalmente infectadas com o YFV (ABREU *et al.*, 2019; MORENO *et al.*, 2011; VASCONCELOS, 2003).

Apesar de *Ae. aegypti* estar amplamente disseminado nos estados brasileiros, a forma urbana da febre amarela permanece sem registros desde 1942, significando que seus vetores naturais têm baixa capacidade para deslocá-la das matas. Nesse sentido, *Ae. albopictus* é uma espécie que merece atenção nos estudos sobre febre amarela pois foi capaz de transmitir o vírus em laboratório e tem potencial para desempenhar papel de vetor ponte da zoonose a partir da borda das florestas (COUTO-LIMA *et al.*, 2017; JOHNSON *et al.*, 2002; PEREIRA DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Mosquitos do gênero *Sabethes* também têm sido encontrados naturalmente infectados pelo YFV e são considerados vetores secundários. A principal espécie do gênero incriminada na transmissão é *Sa. chloropterus*. Sua área de ocorrência se estende do México ao norte da Argentina e Sul do Brasil, incluindo Trinidad (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1965; HERVÉ *et al.*, 1984; VASCONCELOS *et al.*, 2001b). Outras espécies, tais como *Sa. albiprivus*, *Sa. soperi* e *Sa. cyaneus*, têm sido considerados mosquitos importantes na transmissão da febre amarela no Brasil (ABREU *et al.*, 2019; DÉGALLIER *et al.*, 1992; VASCONCELOS *et al.*, 1997, 2001a; VASCONCELOS, 2003).

Os *Sabethes* pertencem à tribo Sabethini da subfamília Culicinae. Seus hábitos são diurnos e acrodendrófilos. As fêmeas realizam a oviposição em *phytotelmata*, lançando seus ovos em pequenos orifícios contendo água acumulada, em especial em buracos de bambus e ocos de árvores. Podem lançar um a dois ovos por vez, continuar a desovar no mesmo criadouro, ou procurar outros locais para disseminar a prole (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; VIEIRA *et al.*, 2020). Criadouros com aberturas pequenas, proporcionam a esses mosquitos uma adaptação de

resistência aos períodos secos do ano, visto que eles têm menor evaporação da água contida em seu interior (FORATTINI, 1965).

2.10 Surto recente de febre amarela no Espírito Santo, Brasil, 2017

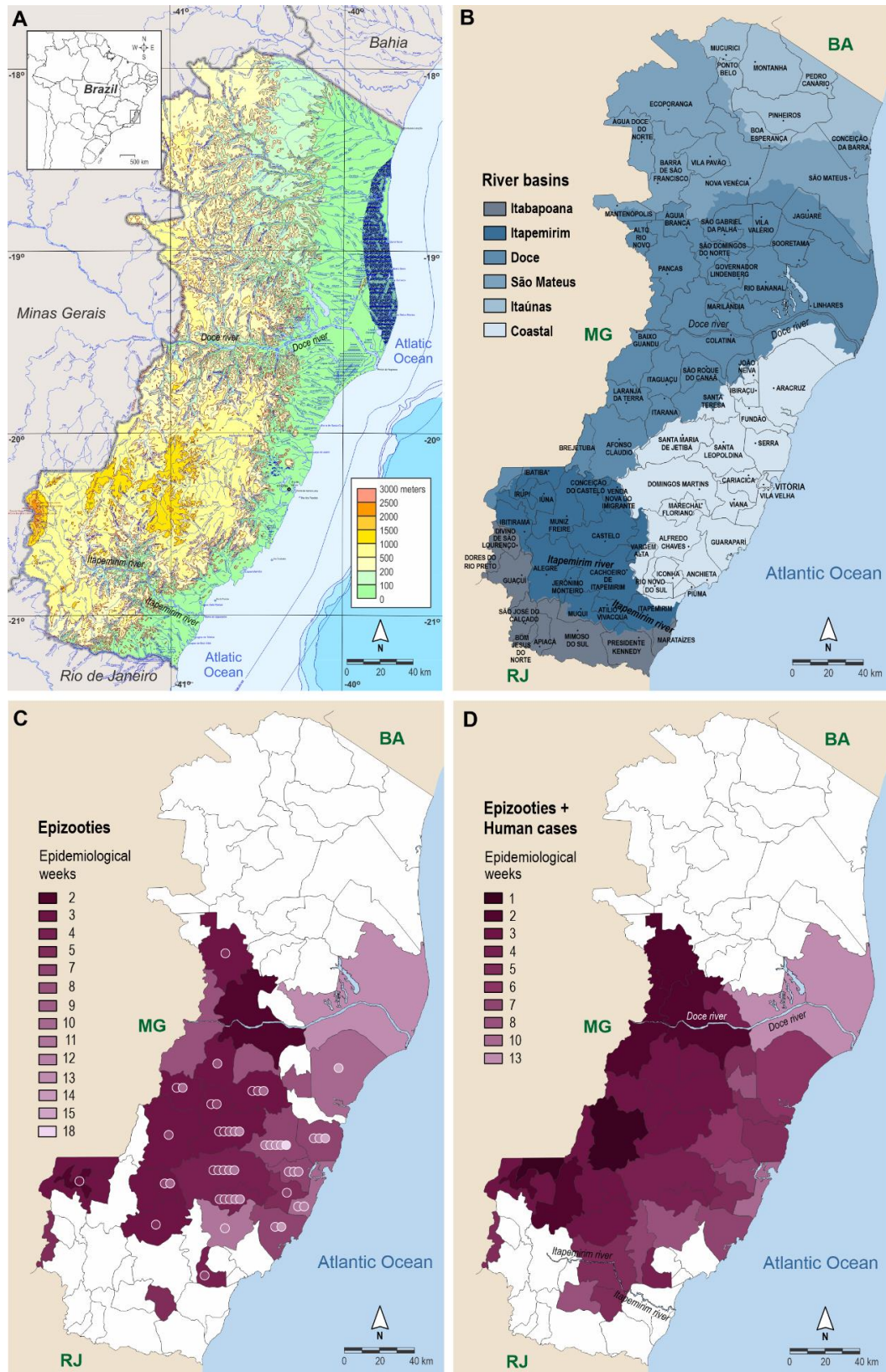
Soper *et al.* (1933) relataram os primeiros casos humanos de febre amarela silvestre em áreas “sem *Ae. aegypti*” no Vale do Canaã – zona de Mata Atlântica, em Santa Teresa (SOPER *et al.*, 1933), estado do Espírito Santo (ES) – durante um grande surto que afetou a região Sudeste do Brasil de 1931 a 1940 (FRANCO, 1969). Ondas epizoóticas intermitentes de YFV ocorreram subsequentemente, mas nenhuma infecção foi detectada no ES desde o início da década de 1930 (POSSAS *et al.*, 2018).

Nas duas últimas décadas, ciclos de expansão do vírus aumentaram sua área de influência no Brasil, em direção ao Sul, ao Sudeste e ao Nordeste (MORENO *et al.*, 2013; ROMANO *et al.*, 2014; VASCONCELOS, 2003). A ampliação da zona epizoótica tem sido motivo de grande preocupação para a saúde pública, uma vez que, na medida em que se ampliam essas zonas, aumentam as chances da reinstalação da febre amarela urbana, particularmente em associação com a presença do seu vetor *Ae. aegypti* (FERREIRA *et al.*, 2011).

Em 2015, o Brasil registrou aumento da atividade do YFV, com a detecção de sucessivos casos epizoóticos e humanos nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. Essa onda epizoótica se espalhou para áreas de Mata Atlântica onde a doença não era registrada há quase oito décadas, e a vacinação não era recomendada (POSSAS *et al.*, 2018). Isso culminou no mais grave surto de febre amarela da história recente do Brasil.

Nesse surto, duas linhagens de YFV se espalharam por diferentes rotas no Sudeste do Brasil, a YFVMG/SP se espalhou da região sudoeste de Minas Gerais (MG) para o estado de São Paulo (SP) e a YFVMG/ES/RJ se disseminou para a porção leste de MG na área de transição entre o Cerrado e a Mata Atlântica em dezembro de 2016, atingindo o oeste do ES em janeiro de 2017, pelas das bacias dos rios Itapemirim e Doce. A partir daí, ela se moveu para leste do estado, alcançando os municípios centrais e litorâneos (Figura 8).

Figura 8 - Difusão espaço-temporal do YFV no estado do Espírito Santo (ES) durante o surto de 2017.



(A) Relevo do ES. (B) Principais bacias hidrográficas pelas quais o YFV entrou no ES em janeiro de 2017, incluindo a Bacia do Rio Doce (ao Norte) e a Bacia do Rio Itapemirim (ao Sul). (C) e (D) difusão espaço-temporal do YFV por semana epidemiológica (SE). Cada município é destacado com a cor

correspondente à SE em que a infecção pelo YFV foi registrada pela primeira vez. Os primeiros casos registrados estão em tom mais escuro, e os tons vão clareando com o tempo. Em C, a evolução espaço-temporal das epizootias registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Os círculos dentro de cada município representam o número de SEs para os quais houve registros de epizootias de YFV. Em (D), os primeiros registros de YFV em cada município, tanto para casos epizooticos (SINAN) quanto humanos (“Sistema de Gerenciador de Ambiente Laboratorial: GAL”). Estados vizinhos: Bahia (BA), Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ). Fonte: autoria própria utilizando o programa QGIS (2020).

Quatro estados do Sudeste do Brasil foram afetados no mesmo ano, MG, ES, SP e Rio de Janeiro (CUNHA *et al.*, 2019; ABREU *et al.*, 2019; DELATORRE *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2017). Mais de 1.600 epizootias, afetando principalmente bugios (*Alouatta guariba clamitans*) e saguis (*Callithrix* spp.), 1.900 casos humanos e 593 mortes humanas foram relatados até abril de 2018 (BRASIL, 2017b, 2018; REZENDE *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Seguidamente aos surtos de São Paulo (2018/2019), o YFV alcançou estados do Sul do país (2019/2020) com menor magnitude, porém, incidiu em áreas que também não registravam a circulação do vírus há décadas e onde a recomendação de vacinação para as populações havia sido recentemente adotada (BRASIL, 2019, 2020; DELATORRE *et al.*, 2019).

A maior incidência de febre amarela ocorreu no ES (4,85 casos humanos por 100.000 habitantes), com a maioria dos casos registrados em indivíduos com ocupações florestais. Dos 78 municípios do ES, 34 foram afetados, com 196 epizootias, 179 infecções humanas confirmadas laboratorialmente e 58 mortes humanas registradas entre janeiro e maio de 2017. Nenhuma circulação de YFV foi detectada desde então (SIQUEIRA *et al.*, 2021).

A má compreensão da dinâmica da transmissão silvestre nessas áreas afetadas, consideradas por décadas como zona livre de YFV no ES, dificulta a avaliação da distribuição viral e a determinação oportuna de áreas de alto risco. As agências brasileiras de vigilância epidemiológica recomendam a investigação entomológica como uma estratégia eficaz para complementar a vigilância e a profilaxia contra o YFV (BRASIL, 2017b).

Especificamente, no caso do ES, onde o YFV ressurgiu após oito décadas sem transmissão, havia absoluta falta de informação se a espécie de vetor seria a mesma implicada na transmissão na Amazônia, no Cerrado, ou em outros países e territórios atingidos pelos recentes surtos. Além disso, não se sabia se haveria uma combinação sinérgica local de espécies de vetores, incluindo vetores ponte, que poderiam promover um transbordamento para uma transmissão periurbana ou urbana.

3 JUSTIFICATIVA

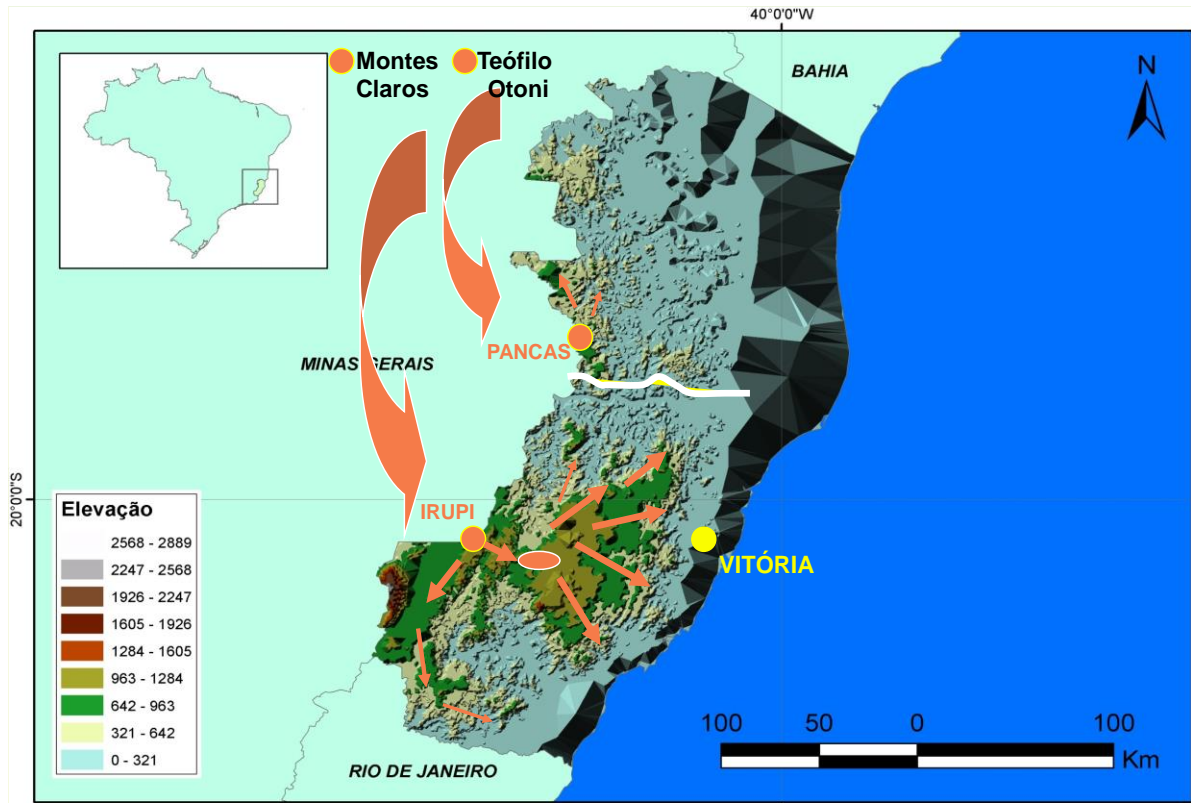
O início do surto de febre amarela na porção oriental do estado de Minas Gerais, em dezembro de 2016, anunciava a disseminação do YFV por bacias hidrográficas até o estado do Espírito Santo. Nessa ocasião, nosso grupo de pesquisa reconhecia a necessidade de ações rápidas para investigar esse momento epidemiológico inédito, a fim de analisar o ciclo completo da transmissão silvestre da doença no estado, visto que em áreas endêmicas, a circulação viral perene impossibilita esse tipo de estudo.

Para o delineamento do estudo e o planejamento dos objetivos e métodos, traçamos um mapa com a previsão de rotas que potencialmente seriam percorridas pelo vírus em sua passagem pelo território capixaba (Figura 9), o qual foi divulgado aos órgãos competentes em tempo de apoiar as ações preventivas. Em nossa previsão, que veio a se confirmar com as notificações dos primeiros casos suspeitos (MOUSSALLEM *et al.*, 2019), a passagem do vírus do estado de Minas Gerais para o Espírito Santo se daria pelas bacias do rio Doce (passando do município de Conselheiro Pena-MG para o município de Pancas-ES) e do rio Itapemirim (passando do município de Manhuaçu-MG para o município de Irupi-ES). Consideramos, como era de se esperar, que o vírus chegaria pelas cabeceiras das bacias hidrográficas, que apresentam relevo acidentado e contêm as maiores glebas de matas e a maior concentração de PNH e de vetores.

Vislumbrava-se, naquela ocasião, a perspectiva de se aproveitar aquele momento epidemiológico, de um surto de febre amarela em uma região onde não se registrava a ocorrência da doença há quase oitenta anos, para tentar responder importantes indagações científicas sobre a transmissão do YFV:

- Como seria a dinâmica de transmissão do YFV, os locais de passagem do vírus, o tempo de circulação viral e extinção natural do ciclo de transmissão silvestre no ES?
- Quais as espécies transmissoras do YFV na Mata Atlântica do Sudeste brasileiro?
- Quais as características biológicas e ecológicas das espécies transmissoras tais como transmissão vertical, distribuição, riqueza, abundância e força de transmissão?

Figura 9 - Mapa do Espírito Santo mostrando as rotas previstas de disseminação da febre amarela em corredores de Mata Atlântica, nas principais bacias hidrográficas do estado.



Fonte: Geobases (ESPÍRITO SANTO, 2020), adaptado pelos autores utilizando o programa QGIS (2020).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o papel das espécies de mosquitos e compreender a dinâmica de transmissão silvestre do YFV durante a epidemia ocorrida no estado do Espírito Santo em 2017, visando a contribuir com ações das vigilâncias entomoviológica e entomoepidemiológica.

4.2 Objetivos específicos

- I. Determinar a riqueza, a diversidade, a abundância e a distribuição de espécies de mosquitos e identificar vetores locais nas áreas de estudo;
- II. Caracterizar a distribuição vertical dos mosquitos nas florestas das áreas de estudo;
- III. Comparar a diversidade, a abundância e as taxas de infecção de importantes vetores durante e após o período de ápice da epidemia, nas áreas estudadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Declaração de ética

Esse estudo foi amparado pela licença científica número 32449-1 fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Ministério do Meio Ambiente (MMA) (Anexo A).

5.2 Área de estudo

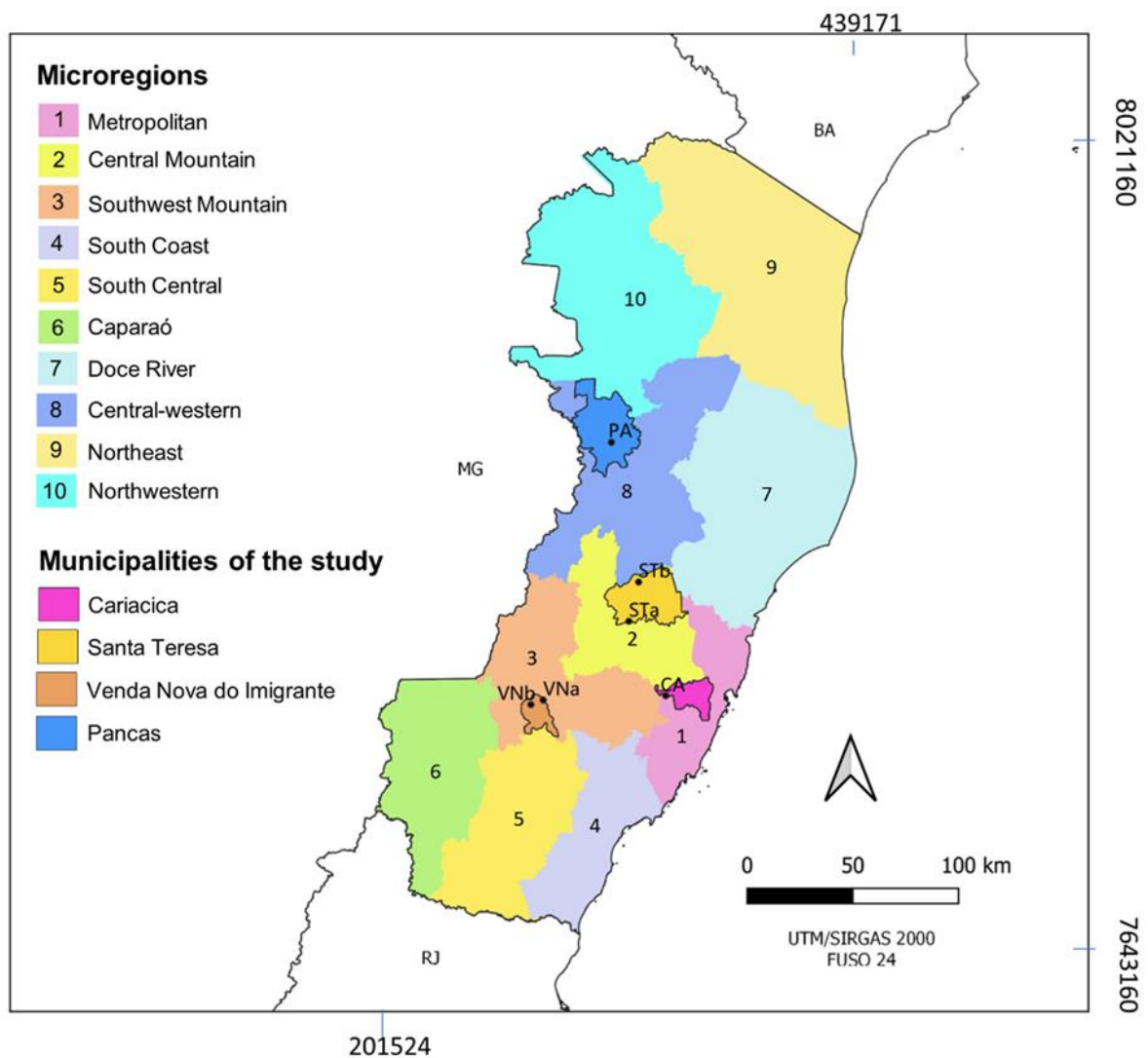
Este estudo foi realizado em seis pontos (áreas) localizados em quatro municípios do Espírito Santo: Santa Teresa (ST), Venda Nova do Imigrante (VN), Pancas (PA) e Cariacica (CA) (Figura 10). Os critérios para selecionar as áreas de estudo foram: (1) epizootia (evento em que um ou mais PNH são encontrados morrendo ou mortos) ou infecções humanas por YFV confirmadas durante o surto de 2017; (2) localização em bacias hidrográficas distintas (Figura 8); (3) localização em microrregiões com diferentes altitudes e condições ambientais; (4) o Vale do Canaã em ST, onde a febre amarela silvestre foi descrita pela primeira vez no início da década de 1930, para a reavaliação da transmissão vetorial local.

Dois pontos localizados em diferentes altitudes foram selecionados em VN e ST: Lavrinhas (VNa, 930 m acima do nível do mar) e Alto Bananeiras (VNb, 1140 m) em VN, e Alto Caldeirão (STa, 870 m) e São João de Petrópolis (STb, 175 m) em ST. Os locais em PA e CA foram Lajinha (170 m) e São Paulo de Viana (610 m), respectivamente (Figura 10 e Quadro 1).

VNa e VNb estão associados a grandes fragmentos florestais na região serrana do sudoeste da Bacia do Rio Itapemirim. Apresentam relevo inclinado, clima frio, temperatura média anual (TMA) de 18,6 °C e precipitação média anual (PMA) de 1364 mm. STa e STb estão na região serrana central do canal sul da Bacia do Rio Doce, em áreas fortemente exploradas para agricultura, com pequenos fragmentos florestais (Figura 11). STa é caracterizada por relevo montanhoso, temperaturas amenas (TMA de 19,5 °C) e PMA de 1.492 mm (Figura 12). STb está localizada em baixa altitude, em um amplo vale ondulado, com clima quente (TMA de 24,4 °C) e seco (PMA de

1.045 mm) (Figura 13). O ponto PA está localizado na região centro-oeste do canal norte da Bacia do Rio Doce. Seu relevo acidentado é marcado por uma grande área rochosa de elevada altitude com matas restritas aos vales. Seu clima é quente (TMA de 24,5 °C) e seco (PMA de 1.192 mm) (Figura 14). CA fica na região metropolitana de Vitória (capital do estado), ao leste, conectando a planície costeira com a área serrana. É a área de floresta mais bem conservada em comparação com os outros locais e tem relevo inclinado e clima quente (TMA de 22,4 °C) e úmido (PMA de 1.539 mm) (INCAPER, 2020) (Figura 15).

Figura 10 - Microrregiões do Espírito Santo destacando os municípios e pontos de amostragem do estudo.



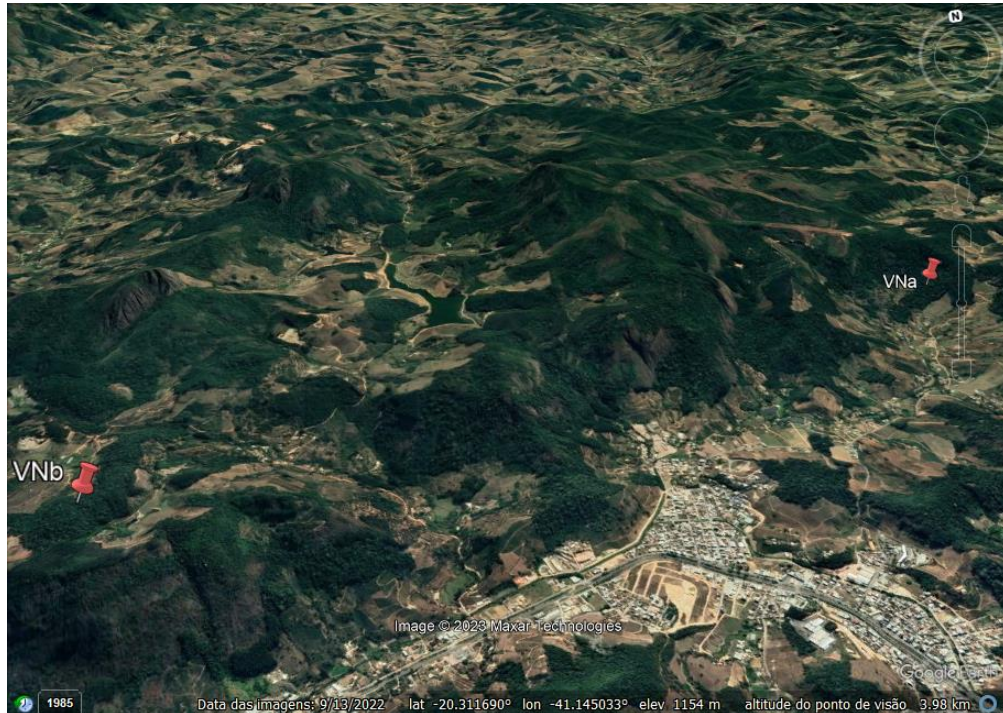
Venda Nova do Imigrante (VNa, -41.111229 W, -20.302705 S e VNb, -41.167397 W, -20.321149 S), Santa Teresa (STa, -40.719653 W, -19.971218 S e STb, -40.673782 W, -19.804625 S), Pancas (PA, -40.789924 W, -19.208688 S) e Cariacica (CA, -40.556154 W, -20.289890 S) (Coordenadas geográficas / Datum SIRGAS 2000). Estados vizinhos: Bahia (BA), Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ). Fonte: autoria própria, utilizando o programa QGIS (2020).

Quadro 1 – Características de paisagem e de clima das áreas onde estão localizados os pontos de amostragem do estudo.

Ponto	Município	Localidade	Altitude	Localização	Características da Paisagem	Características climáticas
STa	Santa Teresa	Alto Caldeirão	870 m	Região serrana central do canal sul da Bacia do Rio Doce	Áreas fortemente exploradas para agricultura, com pequenos fragmentos florestais; relevo montanhoso.	Temperaturas amenas; TMA de 19,5 °C; PMA de 1.492 mm.
STb	Santa Teresa	São João de Petrópolis	175 m	Região serrana central do canal sul da Bacia do Rio Doce	Áreas fortemente exploradas para agricultura, com pequenos fragmentos florestais; amplo vale ondulado.	Clima quente e seco; TMA de 24,4 °C; PMA de 1.045 mm.
VNa	Venda Nova do Imigrante	Lavrinhas	930 m	Região serrana do sudoeste da Bacia do Rio Itapemirim	Grandes fragmentos florestais; relevo inclinado.	Clima frio; TMA de 18,6 °C; PMA de 1364 mm.
VNb	Venda Nova do Imigrante	Alto Bananeiras	1140 m	Região serrana do sudoeste da Bacia do Rio Itapemirim	Grandes fragmentos florestais; relevo inclinado.	Clima frio; TMA de 18,6 °C; PMA de 1364 mm.
PA	Pancas	Lajinha	170 m	Região centro-oeste do canal norte da Bacia do Rio Doce.	Grande área rochosa de elevada altitude com matas restritas aos vales; relevo acidentado.	Clima quente e seco; TMA de 24,5 °C; PMA de 1.192 mm.
CA	Cariacica	São Paulo de Viana	610 m	Região metropolitana de Vitória, ao leste, conectando a planície costeira com a área serrana.	Área de floresta mais bem conservada do estudo; relevo acidentado.	Clima quente e úmido; TMA de 22,4 °C; PMA de 1.539 mm.

Fonte: INCAPER, 2020

Figura 11 – Imagem de satélite da região onde estão localizados os pontos de coleta VNa e VNb, em Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo, Brasil.



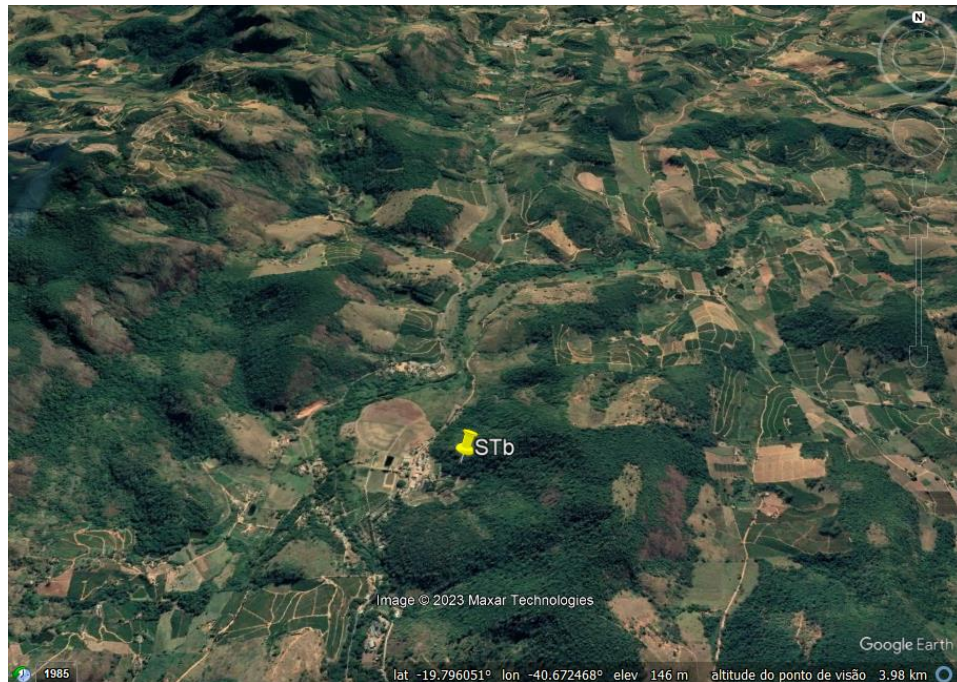
Coordenadas geográficas de VNa: -41.111229 W, -20.302705 S; coordenadas geográficas de VNb: -41.167397 W, -20.321149 S (Datum SIRGAS 2000). Fonte: GOOGLE (2022).

Figura 12 – Imagem de satélite da região onde está localizado o ponto de coleta STa, em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil.



Coordenadas geográficas de STa: -40.719653 W, -19.971218 S (Datum SIRGAS 2000). Fonte: GOOGLE (2022).

Figura 13 – Imagem de satélite da região onde está localizado o ponto de coleta STb, em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil.



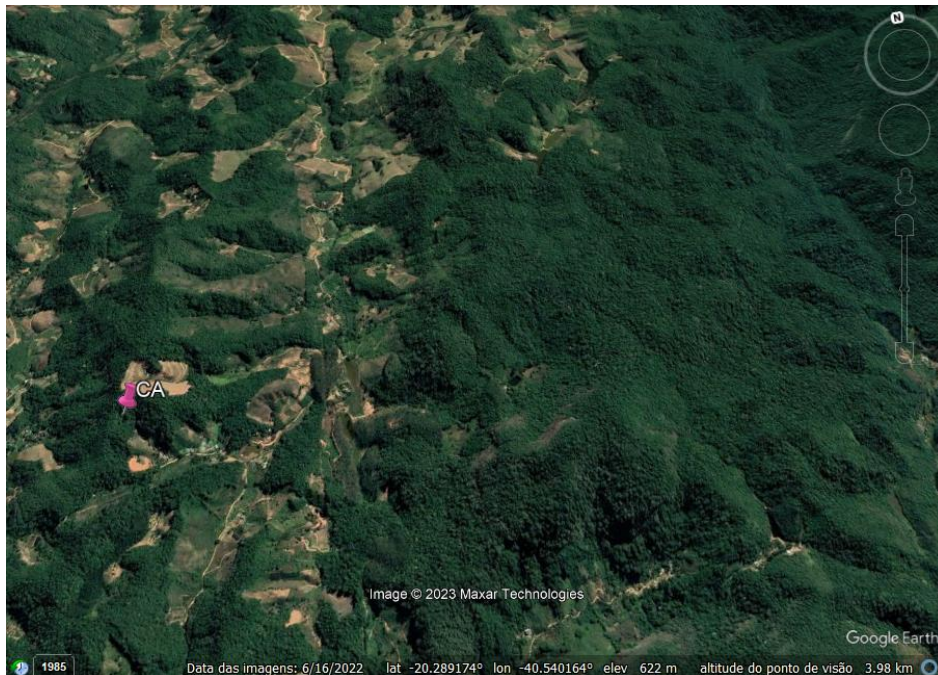
Coordenadas geográficas de STb: $-40,673782$ W, $-19,804625$ S (Datum SIRGAS 2000). Fonte: GOOGLE (2022).

Figura 14 – Imagem de satélite da região onde está localizado o ponto de coleta PA, em Pancas, Espírito Santo, Brasil.



Coordenadas geográficas de PA: $-40,789924$ W, $-19,208688$ S (Datum SIRGAS 2000). Fonte: GOOGLE (2022).

Figura 15 – Imagem de satélite da região onde está localizado o ponto de coleta CA, em Cariacica, Espírito Santo, Brasil.



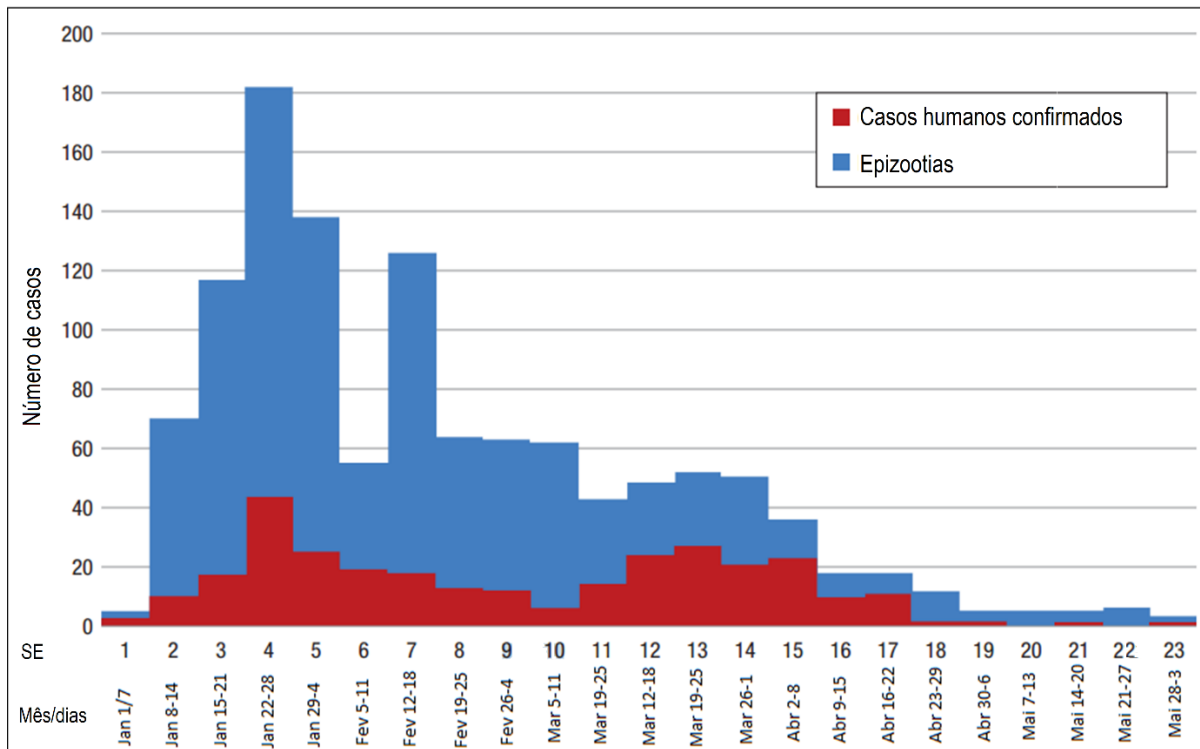
Coordenadas geográficas de CA: $-40,556154$ W, $-20,289890$ S (Datum SIRGAS 2000). Fonte: GOOGLE (2022).

5.3 Cronologia do levantamento entomológico

De acordo com os dados epidemiológicos, o pico de registros de infecções por YFV em humanos e PNH no estado do Espírito Santo, ocorreu entre os meses de janeiro e fevereiro de 2017 (2^a a 9^a SE), com declínio do número de casos a partir do mês de março de 2017 (BRASIL, 2017a; MOUSSALEM *et al.*, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2020) (Figura 16).

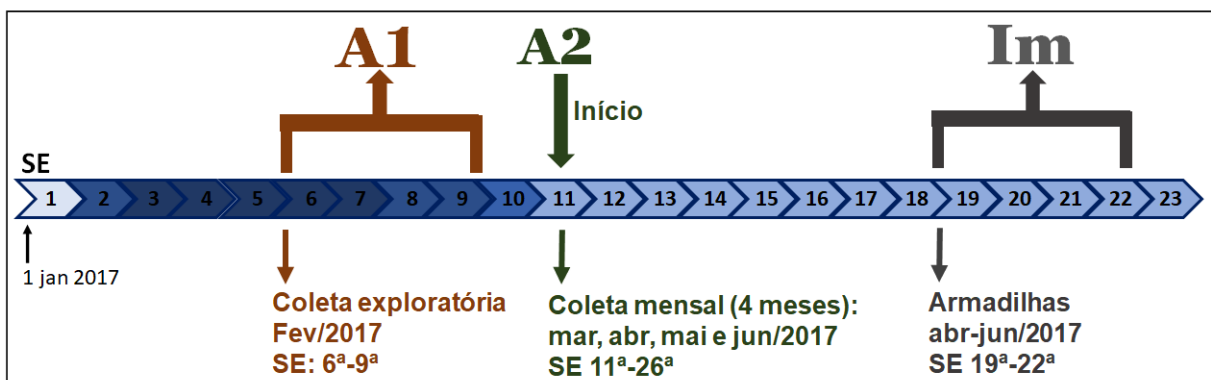
Dentro desse cenário epidemiológico, uma investigação entomológica foi realizada em três grupos de amostragem de mosquitos (amostragem de adultos 1, amostragem de adultos 2 e amostragem de imaturos), durante e após, o ápice da epidemia de febre amarela, conforme apresentado na Figura 17.

Figura 16 - Distribuição dos casos de febre amarela em humanos e de epizootias, por semana epidemiológica (SE), Espírito Santo, Brasil, de janeiro a junho de 2017.



Fonte: MOUSSALEM *et al.* (2019).

Figura 17 – Esquema da cronologia de amostragens do levantamento entomológico desse estudo, por semana epidemiológica (SE), Espírito Santo, 2017.



Os tons mais escuros de azul representam as semanas epidemiológicas (SE) com maior número de registros casos humanos e de epizootias. A1: amostragem de adultos 1, realizada durante o ápice da epidemia de febre amarela, entre a 6^a e a 9^a SE. A2: amostragem de adultos 2, realizada após o ápice da epidemia, mensalmente, de março a junho de 2017 (a partir da 11^a SE). Im: amostragem de imaturos, realizada após o ápice da epidemia, entre a 19^a e a 22^a SE. Fonte: autoria própria segundo os dados de Brasil (2017a) e Moussaalem *et al.* (2019).

5.4 Levantamento Entomológico

Uma investigação entomológica foi realizada durante e após o pico da epidemia de 2017 (MOUSSALLEM *et al.*, 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2020). A coleta de mosquitos adultos e imaturos foi planejada de acordo com o comportamento das espécies vetoras tradicionais do YFV (ou seja, *Haemagogus* e *Sabethes*), que possuem hábitos diurnos e locais de reprodução preferenciais. Os mosquitos adultos foram coletados com atração humana protegida e esclarecida (AHPE) usando redes (puçá entomológico) e tubos de aspiração (capturador de Castro) (Figura 18) (ABREU *et al.*, 2019; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O esforço amostral de todas as coletas foi registrado para assegurar a padronização durante a análise dos resultados.



Figura 18- Fotografia de Puçá entomológico e capturador de sucção oral (capturador de Castro) utilizados na coleta de mosquitos adultos. Fonte: (BRASIL, 2017c).

5.4.1 Amostragem de adultos 1

Um levantamento entomológico foi realizado durante o pico de registros de infecções por YFV em humanos e PNH. Foram investigadas a diversidade e a distribuição de

espécies de mosquitos e os vetores locais foram caracterizados. As coletas de mosquitos foram realizadas no nível do solo, nas seis áreas do estudo (CA, PA, VNa, VNb, STa e STb), de 8 de fevereiro a 2 de março de 2017, entre a 6ª e a 9ª semanas epidemiológicas (SE). Nossa hipótese é de que durante esse pico na transmissão do YFV, uma proporção maior de vetores competentes teria picado previamente os PNH virêmicos.

Em cada local de amostragem, dois a quatro coletores deslocaram-se do mesmo ponto de partida em direções opostas por 50 a 100 m, coletando mosquitos por 30 minutos. O procedimento foi repetido por três a oito horas por dia de amostragem durante dois a cinco dias em cada área de estudo, cobrindo uma área total de aproximadamente quatro hectares.

5.4.2 Amostragem de adultos 2

A distribuição vertical dos mosquitos na floresta, bem como a diversidade de espécies de mosquitos e as taxas de infecção dos vetores foram investigadas. Uma pesquisa mensal foi realizada durante os quatro meses seguintes ao pico epidêmico, de março (11ª SE) a junho (26ª SE) de 2017, para investigar um cenário epidemiológico distinto. As coletas de mosquitos foram realizadas simultaneamente nos níveis de solo e copa das árvores, uma vez por mês, em VNa e PA. A partir dessa amostragem, o número de pontos de coleta foi reduzido, devido às limitações de tempo, de recursos humanos e financeiras. Dois coletores trabalharam de três a oito horas por dia durante dois dias em cada local de estudo. As coletas do dossel foram realizadas em uma plataforma a 15 m (Figura 19) e as coletas em nível do solo foram realizadas conforme descrito para a amostragem de adultos 1, com cada coletor amostrando uma área total de aproximadamente dois hectares ao redor da plataforma.

A frequência de picadas de espécies de mosquitos encontradas naturalmente infectadas com YFV foi estimada durante os dois períodos de amostragem de adultos dividindo o número total de indivíduos pertencentes à mesma espécie que tentava fazer o repasto em um coletor pelo número total de horas gastas na coleta por uma pessoa, em cada local.

Figura 19 - Fotografia de plataforma fixa instalada na copa de uma árvore, no ponto de coleta VNa.



Altura aproximada da plataforma: 15m acima do solo. Notar o coletor posicionado sobre a plataforma, para a realização das coletas de mosquitos silvestres. Fonte: autoria própria.

5.4.3 Amostragem de imaturos

A abundância das principais espécies de vetores e a transmissão vertical do YFV foram investigadas. Após o pico epidêmico, de 30 de abril a 3 de junho de 2017 (entre as 19ª e 22ª SE), foram instaladas armadilhas para coleta de mosquitos imaturos em VNa e CA. Foram utilizadas ovitrampas tradicionais, consideradas adequadas para coleta de *Haemagogus* spp. (COUTO-LIMA *et al.*, 2020), e armadilhas de bambu (seções de entrenós de bambu) com pequenos orifícios laterais (SERVICE, 1993), simulando os habitats larvais naturais de vários *Sabethes* spp. (Figura 20). As ovitrampas consistiam em potes de plástico preto contendo cerca de 300 mL de água de nascente e uma pá de compensado (Eucatex, Brasil) como suporte para a oviposição (FAY; ELIASON, 1966).

Foram instaladas 40 armadilhas por local. Dez conjuntos de armadilhas foram instalados a aproximadamente 20 m de distância entre si. Cada conjunto foi composto por quatro armadilhas fixadas na mesma árvore, sendo uma ovitrampa e uma armadilha de bambu suspensas a 6 m e outro par de armadilhas a 1,2 m.

Após a instalação, as armadilhas foram inspecionadas a cada sete a dez dias e operadas por um período semelhante a cada mês. A água nelas contida era coletada e conduzida ao laboratório. As armadilhas eram em seguida, recarregadas com água doce, sem que se trocasse a paleta. As paletas foram imersas em água para estimular a eclosão dos ovos em laboratório. As formas imaturas foram criadas até a emergência dos adultos, conforme Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos adultos coletados durante o trabalho de campo ou criados em laboratório foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para investigação de infecção viral.

Figura 20 - Fotografia de armadilhas utilizadas para coleta de formas imaturas de mosquitos.



(A) Armadilha de bambu, simulando o criadouro natural de mosquitos dos gêneros *Sabethes* spp. Foram feitos orifícios na taquara por onde as fêmeas de mosquitos silvestres pudessem lançar os seus ovos na água acumulada no interior. (B) Ovitampa, comumente empregada para a coleta de *Aedes aegypti* em ambientes urbanos e, nesse estudo, empregada para a coleta de *Haemagogus* spp. em ambiente silvestre. Fonte: autoria própria.

5.5 Caracterização Taxonômica

A identificação das espécies foi realizada em uma mesa fria acoplada a um estereoscópio, usando chaves taxonômicas (Figura 21) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; CORREA; RAMALHO, 1956; FORATTINI, 2002; LANE, 1953; NEVES, 2019; SALLUM *et al.*, 2020). Exemplos testemunhas foram depositados na Coleção de Culicidae (CCULI) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Figura 21 - Fotografia de estereoscópio (lupa) acoplado a mesa fria utilizado para a identificação de mosquitos criopreservados.



Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ). Fonte: autoria própria.

Os mosquitos foram agrupados por espécie, local e data de amostragem em um meio de cultura L15, complementado com antibiótico e antifúngico e com 20% de soro bovino fetal. Um *pool* continha no máximo cinco indivíduos se pertencessem às espécies dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, que incluem aqueles considerados vetores primários ou secundários do YFV, ou dez indivíduos para as demais espécies. Assim, após todos os mosquitos de uma dada espécie, local e tempo de amostragem terem sido agrupados de acordo com esse critério, aqueles remanescentes compuseram *pools* coespecíficos com menor número de indivíduos. Espécimes machos e fêmeas alimentados com sangue foram armazenados em criotubos separados. As amostras foram armazenadas a -80 °C para detecção do genoma viral.

5.6 Detecção de YFV

Os *pools* de mosquitos foram triturados em homogeneizador de tecidos *Precellys 24* (Bertin Corp, Rockville, MA, EUA) e centrifugados a 9600 × *g* por 10 minutos a 4 °C. O RNA foi extraído de 140 µL do sobrenadante usando *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Germantown, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A detecção do YFV foi realizada por RT-qPCR utilizando *Kit Febre Amarela IBMP* (reação *one step*, multiplex, com controle positivo interno-CI e, com perfil qualitativo de análise), produzido pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná e *QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A configuração dos alvos de corrida (Quadro 2), os parâmetros de ciclagem da reação de PCR (Quadro 3), a configuração dos parâmetros de análise para os alvos febre amarela e controle interno (Quadro 4) e os critérios de classificação para amostras avaliadas (Quadro 5) foram definidos de acordo com as recomendações do fabricante do *Kit Febre Amarela IBMP*. As amostras foram examinadas em duplicata e utilizou-se controle negativo e controle positivo externo.

Quadro 2 - Configurações dos alvos da corrida.

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
FA	FAM	NFQ-MGB	Red
CI	VIC	NFQ-MGB	Blue

FA: Febre amarela; CI: Controle interno. Fonte: IBMP (2020).

Quadro 3 - Parâmetros de ciclagem da reação de PCR na programação da corrida

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (mm:ss)
<i> Holding Stage </i>	50	15:00
<i> Holding Stage </i>	95	10:00
<i> Cycling Stage (45x) </i>	95	00:15
	60*	00:45

*Captura de fluorescência (*Data Collection On*). Fonte: IBMP (2020).

Quadro 4 - Configuração dos parâmetros de análise para os alvos febre amarela controle interno.

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
FA	100.000	6	15
CI	10.000	6	15

FA: Febre amarela; CI: Controle interno. Fonte: IBMP (2020).

Quadro 5 - Critérios de classificação para amostras avaliadas.

Resultado	CT de FA	CT de CI
Positivo	< 45	< 30
Negativo	Ausência de amplificação	< 30

CT: *Cycle Threshold*; FA: Febre amarela; CI: Controle interno. Fonte: IBMP (2020).

5.7 Análise de dados

Os dados foram analisados usando o software R (R CORE TEAM, 2020). A composição da comunidade de mosquitos em cada local de amostragem e o tempo de amostragem foram determinados com o Índice de Diversidade de Shannon-Weaver (H') (SHANNON, 1948). A frequência de cada espécie de mosquito nos extratos verticais da floresta (níveis de solo e dossel) com base nos dados de amostragem de adultos 2 foi comparada usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney U com $\alpha < 0,05$. As taxas de infecção foram calculadas usando o pacote R PooledInfRate. A taxa mínima de infecção (MIR) foi obtida dividindo-se o número de *pools* positivos para YFV pelo número total de adultos para a espécie e multiplicando-se o resultado por 1.000. A estimativa de probabilidade máxima por 1.000 mosquitos (MLE) foi calculada como $= 1 - (1 - Y/X)^{1/m}$, onde Y é o número de *pools* positivos, X é o número total de *pools* e m é o tamanho de cada *pool* testado. Os gráficos foram produzidos usando o pacote R ggplot2 (WICKHAM, 2009). Os mapas foram criados usando o programa QGIS (QGIS, 2020).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão desse trabalho estão contidos no artigo publicado na revista *Viruses*, em 14 de dezembro de 2022, intitulado “Back to Where it Was first Described: Vectors of Sylvatic Yellow Fever Transmission in the 2017 Outbreak in Espírito Santo, Brazil” o qual é apresentado nas páginas seguintes e cuja referência é:

STANZANI, L. M. A. *et al.* Back to Where It Was First Described: Vectors of Sylvatic Yellow Fever Transmission in the 2017 Outbreak in Espírito Santo, Brazil. **Viruses**, s.l. v.14, n. 12, p. 1-18, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/v14122805>. Disponível em: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/viruses-14-02805-v3%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/viruses-14-02805-v3%20(1).pdf). Acesso em: 28 fev 2023.

Por meio de levantamentos entomológicos e detecção molecular viral, esse estudo investigou a transmissão silvestre do YFV logo após os primeiros casos confirmados de sua circulação em janeiro de 2017, fornecendo contribuições inéditas para uma melhor compreensão da dinâmica da transmissão silvestre e da avaliação da distribuição viral e para a determinação oportuna de áreas de alto risco.

Os objetivos propostos foram alcançados e estão apresentados nesse artigo que entrega os resultados do mais abrangente estudo sobre a fauna de mosquitos e vetores da febre amarela no estado do Espírito Santo, incluindo o local onde o ciclo silvestre do YFV foi descrito pela primeira vez no mundo.

Os resultados trazem uma contribuição significativa para a literatura porque a área do Espírito Santo teve as maiores taxas de incidência de febre amarela neste surto sul-americano de 2017, o que a torna uma importante região focal no manejo da febre amarela no Brasil. Além disso, o estudo avaliou a transmissão silvestre do YFV, 80 anos após a última grande epidemia e pode, portanto, discutir os esquemas nacionais de vacinação e os procedimentos de saúde pública necessários. Foram analisados mais de 10 mil mosquitos de 78 espécies e, adicionalmente, foi feita uma retrospectiva histórica desde a década de 1930, quando a febre amarela silvestre foi descrita pela primeira vez nesta área.

Article

Back to Where It Was First Described: Vectors of Sylvatic Yellow Fever Transmission in the 2017 Outbreak in Espírito Santo, Brazil

Luciana Matos de Abreu Stanzani ^{1,2,*}, Monique de Albuquerque Motta ², Rafael Santos Erbisti ³, Filipe Vieira Santos de Abreu ^{2,4}, Agostinho Cardoso Nascimento-Pereira ², Anielly Ferreira-de-Brito ², Maycon Sebastião Alberto Santos Neves ², Gláucio Rocha Pereira ², Glauber Rocha Pereira ², Claudiney Biral dos Santos ¹, Israel de Souza Pinto ^{1,5}, Creuza Rachel Vicente ¹, Álvaro Adolfo Faccini-Martínez ^{1,6,7}, Karina Ribeiro Leite Jardim Cavalcante ⁸, Aloísio Falqueto ^{1,†} and Ricardo Lourenço-de-Oliveira ^{2,*}

¹ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 29040-090, ES, Brazil

² Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil

³ Departamento de Estatística, Universidade Federal Fluminense, Niterói 24210-201, RJ, Brazil

⁴ Laboratório de Comportamento de Insetos, Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Campus Salinas, Salinas 39560-000, MG, Brazil

⁵ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Itaituba, Itaituba 68183-300, PA, Brazil

⁶ Research Institute, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud—FUCS, Bogotá 110911, Colombia

⁷ Servicios y Asesorías en Infectología—SAI, Bogotá 110011, Colombia

⁸ Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília 70000-000, DF, Brazil

* Correspondence: luciana.abreu@ufes.br (L.M.d.A.S.); lourenco@ioc.fiocruz.br (R.L.-d.-O.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Stanzani, L.M.d.A.; Motta, M.d.A.; Erbisti, R.S.; Abreu, F.V.S.d.; Nascimento-Pereira, A.C.;

Ferreira-de-Brito, A.; Neves, M.S.A.S.;

Pereira, G.R.; Pereira, G.R.; Santos,

C.B.d.; et al. Back to Where It Was

First Described: Vectors of Sylvatic

Yellow Fever Transmission in the

2017 Outbreak in Espírito Santo,

Brazil. *Viruses* **2023**, *14*, 2805.

<https://doi.org/10.3390/v14122805>

Academic Editors: Ana Cecília

Ribeiro Cruz and Jianying Liu

Received: 16 November 2022

Accepted: 13 December 2022

Published: 15 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Evidence of sylvatic yellow fever was first reported in Atlantic Forest areas in Espírito Santo, Brazil, during a yellow fever virus (YFV) outbreak in 1931. An entomological survey was conducted in six forest sites during and after an outbreak reported ~80 years after the last case in the area. Among 10,658 mosquitoes of 78 species, *Haemagogus leucocelaenus*, and *Hg. janthinomys/capricornii* were considered the main vectors as they had a relatively high abundance, co-occurred in essentially all areas, and showed high YFV infection rates. *Sabethes chloropterus*, *Sa. soperi*, *Sa. identicus*, *Aedes aureolineatus*, and *Shannoniana fluviatilis* may have a secondary role in transmission. This is the first report of *Sa. identicus*, *Ae. aureolineatus*, and *Sh. fluviatilis* infected with YFV. Our study emphasizes the importance of entomological monitoring and maintenance of high vaccination coverage in receptive areas to YFV transmission.

Keywords: yellow fever; Culicidae; arbovirus; vector-borne-diseases; Atlantic Forest; *Haemagogus*; *Sabethes*; *Aedes*; *Shannoniana*

1. Introduction

Yellow fever is an acute infectious disease of humans and non-human primates (NHPs). It is endemic to tropical and sub-tropical Africa and Latin America and has recently emerged in non-endemic areas of these continents. Its etiologic agent is yellow fever virus (YFV), a positive-sense single-stranded RNA arbovirus of the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae*), which is transmitted between vertebrates by competent female mosquito vectors [1,2].

The transmission of YFV can occur through two main epidemiological cycles: urban and sylvatic. In the urban cycle, humans are the only vertebrate hosts, and the domestic mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* is the vector. In Brazil, this cycle has not occurred since 1942 [3,4]. In the sylvatic cycle, arboreal mosquitoes of the genera *Haemagogus* and *Sabethes*

are the most important vectors of YFV in the Americas. The amplifier vertebrate hosts are NHPs, and humans are infected when they approach or enter an enzootic forest [5–7].

Soper et al. (1933) reported the first human cases of sylvatic yellow fever in areas “without *Aedes aegypti*” in the Canaan Valley—an Atlantic Forest zone in Santa Teresa (ST) [8], state of Espírito Santo (ES)—during a large YFV epidemic that affected southeastern Brazil from 1931 to 1940 [3]. Intermittent epizootic waves of YFV have subsequently occurred, but no YFV infections have been detected in ES since the early 1930s [2].

In 2015, Brazil recorded increased YFV activity, with the detection of successive epizootic and human cases in the midwestern and southeastern regions. This YFV epizootic wave spread into Atlantic Forest areas where the disease had not been recorded for almost eight decades, and vaccination was not recommended [2]. This culminated in the most severe outbreak of yellow fever in the recent history of Brazil.

In this outbreak, two YFV lineages spread by different routes in southeastern Brazil: the YFV_{MG/SP} spread from the southwestern area of Minas Gerais (MG) to São Paulo (SP) state and the YFV_{MG/ES/RJ} that moved to the eastern portion of MG in the transition area between the Cerrado (a savannah-like bioregion) and Atlantic Forest in December 2016 and reached the west of ES in January 2017 via the Itapemirim and Doce River basins and moved eastward to the central and coastal municipalities (Figure 1). Four states in southeast Brazil were affected in the same year, including MG, ES, SP, and Rio de Janeiro [7,9–11]. More than 1600 epizootics, affecting mainly howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) and marmosets (*Callithrix* spp.), 1900 human cases, and 593 human deaths were reported up to April 2018 [12–15].

The highest incidence of yellow fever occurred in ES (4.85 human cases per 100,000 inhabitants), with most cases recorded in individuals with forest-related occupations. Of the 78 ES municipalities, 34 were affected, with 196 epizootics, 179 laboratory-confirmed human infections, and 58 human deaths recorded between January and May 2017. No circulation of YFV has been detected since then [16].

A poor understanding of sylvatic transmission dynamics in these affected areas, considered the YFV-free zone for decades in ES, hinders the evaluation of the viral distribution and timely determination of high-risk areas. Brazilian epidemiological surveillance agencies recommend entomological investigation as an effective strategy to supplement YFV surveillance and prophylaxis [12]. Specifically, in the case of ES, where YFV re-emerged after eight decades without transmission, there was an absolute lack of information on whether the vector species would be the same as that implicated in transmission in the Amazon, Cerrado, or other countries or territories touched in the recent outbreaks. Also, it was unknown if there would be a local synergistic combination of vector species, including bridge vectors, that could promote a spill-over to a peri-urban or urban transmission. Accordingly, using entomological surveys, this study investigated the sylvatic YFV transmission in ES shortly after the first confirmed cases of viral circulation in January 2017. We aimed to (1) determine the richness, diversity, abundance, and distribution of mosquito species and identify local vectors; (2) characterize the vertical distribution of mosquitoes in forests; and (3) compare the diversity, abundance, and infection rates of important vectors during and after the epidemic peak. Sampling was conducted in six distinct forest areas to represent the different microregions affected by the YFV outbreak. The ST municipality, where transmission of sylvatic yellow fever was first described [8], was also included.

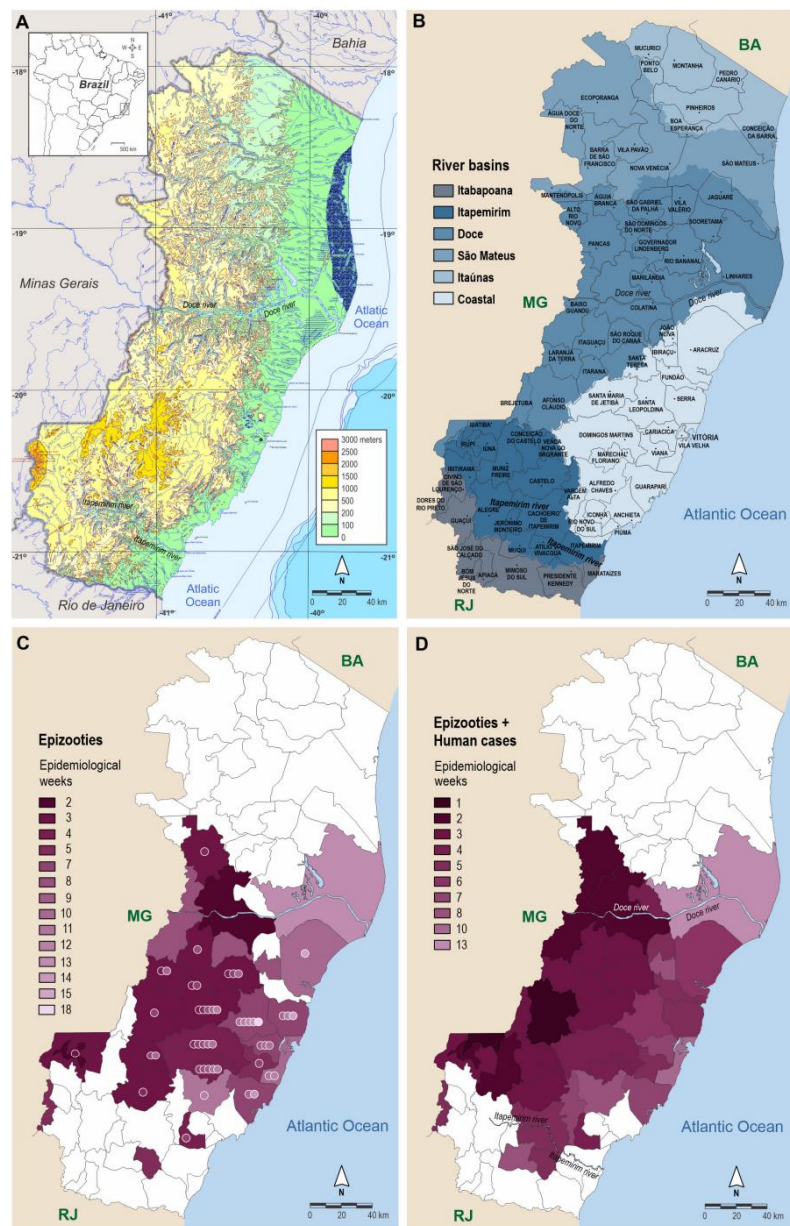


Figure 1. Spatiotemporal spread of YFV in the state of Espírito Santo (ES) during the 2017 outbreak. (A) Relief of ES. (B) Main river basins through which the virus entered the state in January 2017, including the Doce River Basin (to the North) and Itapemirim River Basin (to the South). (C,D) spatiotemporal spread of YFV by epidemiological week (EW). Each municipality is highlighted with the colour corresponding to the EW in which the YFV infection was first registered. In C, the spatiotemporal evolution of epizootics registered in the Notifiable Diseases Information System (“Sistema de Informação de Agravos de Notificação: SINAN”). The circles within each municipality represent the number of EWs for which there were YFV epizootic records. In (D), the first records of YFV in each municipality for both epizootic (SINAN) and human cases (“Sistema de Gerenciador de Ambiente Laboratorial: GAL”). Neighboring states: Bahia (BA), Minas Gerais (MG), and Rio de Janeiro (RJ).

2. Materials and Methods

This study was conducted at six sites located in four municipalities of ES: ST, Venda Nova do Imigrante (VN), Pancas (PA), and Cariacica (CA) (Figure 2). The criteria for selecting the study sites were as follows: (1) confirmed YFV epizootic (event in which one or more NHPs are found dying or dead) or human infections during the 2017 outbreak; localization (2) in distinct river basins (Figure 1); (3) microregions with different altitudes and environmental conditions (Figure 2); and (4) the Canaan Valley in ST, where sylvatic yellow fever was first described early in the 1930's, for the reassessment of local vector transmission. Two sites located at different altitudes were selected in VN and ST: Lavrinhas (VNa, 930 m above sea level) and Alto Bananeiras (VNB, 1140 m) in VN, and Alto Caldeirão (STa, 870 m) and São João de Petrópolis (STb, 175 m) in ST. The sites in PA and CA were Lajinha (170 m) and São Paulo de Viana (610 m), respectively (Figure 2).

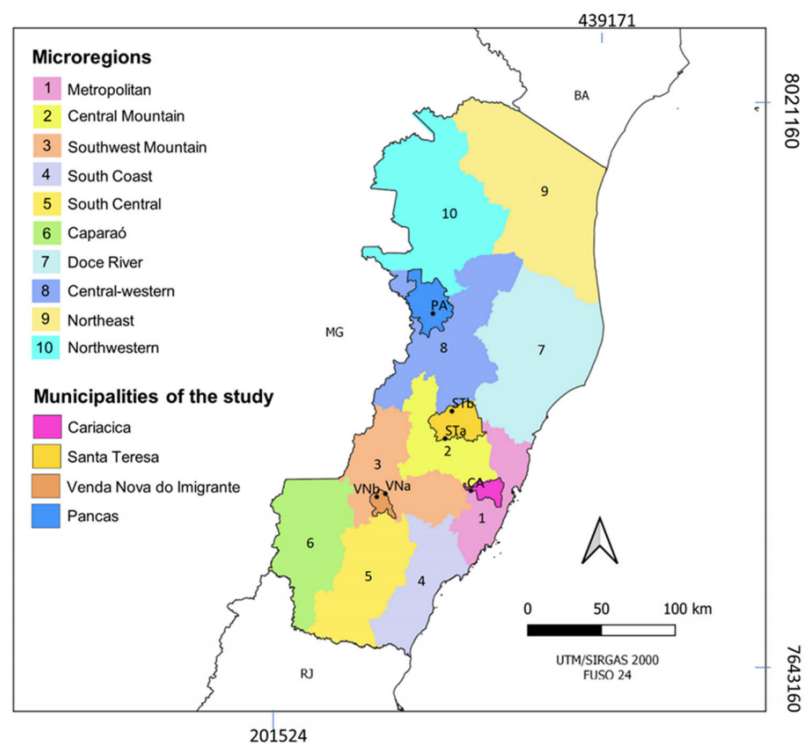


Figure 2. Microregions in Espirito Santo highlighting the municipalities and study sites: Venda Nova do Imigrante (VNa, -41.111229 W, -20.302705 S and VNB, -41.167397 W, -20.321149 S), Santa Teresa (STa, -40.719653 W, -19.971218 S and STb, -40.673782 W, -19.804625 S), Pancas (PA, -40.789924 W, -19.208688 S), and Cariacica (CA, -40.556154 W, -20.289890 S). Neighboring states: Bahia (BA), Minas Gerais (MG), and Rio de Janeiro (RJ).

VNa and VNB are associated with large forest fragments in the southwest mountain region of the Itapemirim River Basin. They have a sloping relief, cold climate, mean annual temperature (MAT) of 18.6 °C and mean annual precipitation (MAP) of 1364 mm. STa and STb are in the central mountain region of the southern channel of the Rio Doce Basin, in areas heavily exploited for agriculture, with small forest fragments. STa is characterized by a mountainous relief, mild temperatures (MAT 19.5 °C), and a MAP of 1492 mm. STb is located at a low altitude in a wide undulating valley with a warm (MAT 24.4 °C) and dry (MAP 1045 mm) climate. PA is in the central-western region of the northern channel of the Rio Doce Basin. Its rugged relief is marked by a large rocky area of high elevation with forests restricted to the valleys. Its climate is warm (MAT 24.5 °C) and dry

(MAP 1192 mm). CA is in the metropolitan region of Vitória (the state capital) in the east, connecting the coastal plain and mountainous area of the state. It is the best-conserved forest area compared to the other sites, has a sloping relief, and a warm (MAT 22.4 °C) and wet (MAP 1539 mm) climate [17].

2.1. Entomological Surveys

Entomological surveys were conducted during and after the peak of the 2017 epidemic [16–18]. The collection of adult and immature mosquitoes was planned according to the behavior of traditional YFV vector species (i.e., *Haemagogus* and *Sabethes*), which have daytime habits and preferred breeding sites. Adult mosquitoes were captured with protected human attraction using nets and aspiration tubes [7–19].

Adult sampling 1: An exploratory survey was conducted during the peak of records of YFV infections in humans and NHPs. We investigated the diversity and distribution of mosquito species and characterized the local vectors. Mosquito collections were conducted at ground level from 8 February to 2 March 2017, between the 6th and 9th epidemiological weeks (EWs). We hypothesized that during this peak in YFV transmission, a higher proportion of competent vectors would have previously bitten viremic NHPs. At each sampling site, two to four collectors moved from the same departure point in opposite directions for 50–100 m, capturing mosquitoes for 30 min. The procedure was repeated for 3 to 8 h per sampling day and 2 to 5 d in each study area, covering a total area of approximately 4 ha.

Adult sampling 2: We investigated the vertical distribution of mosquitoes in the forest, as well as mosquito species diversity and infection rates of vectors. A monthly survey was conducted during the four months following the epidemic peak, from March (11th EW) to June (26th EWs) 2017, to investigate a distinct epidemiological scenario. Mosquito captures were conducted simultaneously at the ground and tree canopy levels once a month at VNa and PA. Two collectors worked for 3–8 h daily for two days at each study site. Canopy captures were performed on a platform at 15 m; ground-level captures were performed as described for adult sampling 1, with each collector sampling a total area of ~2 ha around the platform.

We estimated the biting frequency of mosquito species found naturally infected with YFV during both adult sampling times by dividing the total number of individuals belonging to the same species attempting to feed on one person by the total number of hours spent on capture by one person at each site.

Immature sampling: We investigated the abundance of the main vector species and the vertical transmission of YFV. After the epidemic peak, from 30 April to 3 June 2017 (between the 19th and 22nd EWs), traps for the collection of immature mosquitoes were installed in VNa and CA. We used traditional ovitraps, considered appropriate for collecting *Haemagogus* spp. [20], and bamboo traps (sections of bamboo internodes) with small lateral holes [21] simulating the natural larval habitats of several *Sabethes* spp. The ovitraps consisted of black plastic jars containing nearly 300 mL of spring water and one plywood paddle (Eucatex, São Paulo, Brazil) as support for oviposition [22]. We installed 40 traps per site; ten sets of traps were installed approximately 20 m apart. Each set was composed of four traps set in the same tree, with one ovitrap and one bamboo trap suspended at 6 m and another couple of traps at 1.2 m. The traps were collected 7 to 10 d after installation and refilled with fresh water without changing the paddle; the traps were operated for a similar period each month. The paddles were immersed in water to stimulate egg hatching in the laboratory. The immature forms were reared until adult emergence, according to Consoli and Lourenço-de-Oliveira (1994) [19].

Adult mosquitoes captured during fieldwork or reared in the laboratory were immediately frozen in liquid nitrogen for investigation of viral infection.

2.2. Taxonomic Characterization

Species identification was performed on a cold table using the taxonomic keys [19,23–26]. Voucher specimens were deposited in the Culicidae Collection, Instituto Oswaldo Cruz. Mosquitoes were pooled by species, location, and sampling date in an L15 culture medium with 20% fetal bovine serum. A pool contained a maximum of five individuals if they belong to species of tribe Aedini (genera *Haemagogus*, *Aedes*, and *Psorophora*) and genus *Sabethes*, that include those considered primary or secondary vector, or ten individuals if the genus was not yet recognized as a YFV vector. So, after all mosquitoes of a given species, site, and sampling time were grouped according to this criterion, the remaining mosquitoes composed conspecific pools with a smaller number of individuals. Blood-fed female and male specimens were stored in separate cryotubes. Samples were stored at -80°C for viral genome detection.

2.3. YFV Detection

Mosquito pools were ground in a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Corp, Rockville, MA, USA) and centrifuged at $9600 \times g$ for 10 min at 4°C . RNA was extracted from 140 μL of the supernatant using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. YFV detection was performed by RT-qPCR using a "Yellow Fever IBMP Kit" (1-step and multiplex with internal control)—produced by the Institute of Molecular Biology of Paraná—and QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The samples were examined in duplicate; negative and positive controls were used for each reaction as previously described [7].

2.4. Statistical Analysis

Data were analyzed using R software [27]. Mosquito community composition at each sampling site and sampling time was determined with the Shannon-Weaver Diversity Index (H') [28]. The frequency of each mosquito species in the vertical extracts of the forest (ground and canopy levels) based on the adult sampling 2 data were compared using a non-parametric Mann-Whitney U test with $\alpha < 0.05$. Infection rates were calculated using the R package PooledInfRate. The minimum infection rate (MIR) was obtained by dividing the number of YFV-positive pools by the total number of adults for the species multiplied by 1000. The maximum likelihood estimate per 1000 mosquitoes (MLE) was calculated as $1 - (1 - Y/X)^{1/m}$, where Y is the number of positive pools, X is the total number of pools, and m is the size of each tested pool. Graphs were produced using the R package ggplot2 [29]. Maps were created using QGIS 3.12.2 [30].

3. Results

3.1. Entomological Survey Results

A total of 10,658 mosquitoes from 14 genera and 78 species were collected (Tables 1 and S1), of which 99.87% and 0.13% were Culicinae and Anophelinae, respectively. Most samples were adult mosquitoes (95.17%), and 515 immature individuals (4.83%) were collected in ovitraps (Table 1).

The Sabethini tribe was the most abundant (80.67%) and had the highest species richness (51 taxa), followed by the Aedini tribe (16.62% with 14 species, Table 1).

The ten most common species were, in decreasing order of abundance, *Wyeomyia palmata/galvaoi* (10.69%), *Wy. aff. davisi* (9.90%), *Limatus durhamii* (9.49%), *Wy. incaudata* (5.11%), *Li. pseudomethysticus* (4.64%), *Haemagogus leucocelaenus* (4.45%), *Wy. edwardsi* (3.90%), *Ae. scapularis* (3.81%), *Trichoprosopon castroi/similis* (3.64%), and *Shannoniana fluviatilis* (3.13%).

Mosquito species diversity (Shannon-Weaver index) varied among sampling sites and sampling time, with STb displaying the lowest H' values and CA and PA the highest (Tables 1 and S2). *Hg. leucocelaenus*, *Psorophora ferox*, *Onirion personatum*, *Wy. lutzii*, *Wy. sabethea*, *Wy. bourrouli/forcipenis* and species of the Serratus group of *Aedes* [19,31] were found in all six sites.

Table 1. Mosquito species identified at the six study sites located in four municipalities of Espírito Santo, including Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), from February to June 2017.

Taxon	Adults						Immature		Total	Ab (%) ¹
	CA	PA	STa	STb	VNa	VNb	CA	VNA		
Subfamily Anophelinae	2		4		8				14	0.1
Tribe Anophelini	2		4		8				14	0.1
<i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> Dyar & Knab, 1908			3		4				7	0.07
<i>Anopheles (Kerteszia) laneanus?</i> (Corrêa & Cerqueira, 1944)					2				2	0.02
<i>Anopheles (Kerteszia)</i> sp.					2				2	0.02
<i>Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus</i> (Neiva & Pinto, 1922)			1						1	0.01
<i>Anopheles (Stethomyia) nimbus</i> (Theobald, 1902)/ <i>thomasi</i> Shannon, 1933/ <i>acanthotorynus</i> Komp 1937	2								2	0.02
Subfamily Culicinae	2005	3170	886	310	2677	1081	258	257	10,644	99.9
Tribe Aedini	181	749	439	184	181	37			1771	16.6
<i>Aedes (Howardina) aureolineatus</i> Berlin, 1969	35		17	1	29				82	0.77
<i>Aedes (Howardina) fulvithorax</i> (Lutz, 1904)	2				2				4	0.04
<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> (Rondani, 1848)	2	183	187	31	3				406	3.81
<i>Aedes (Ochlerotatus) serratus</i> (Theobald, 1901)/ <i>hastatus</i> Dyar, 1922/ <i>oligopistus</i> Dyar, 1918/ <i>eucephalaenus</i> Dyar, 1918	2	52	38	1	2	1			96	0.90
<i>Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus</i> (Wiedemann, 1821)			1						1	0.01
<i>Aedes (Protoclaeaya) terrens</i> (Walker, 1856)	3	3	16		43	3			68	0.64
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)			1						1	0.01
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1894)	7	95	4	106		1			213	2.00
<i>Aedes</i> sp.			1			1			2	0.02
<i>Haemagogus (Haemagogus) janthinomys</i> Dyar, 1921/ <i>Hg. capricornii</i> Lutz, 1904	10	21	7	17	15				70	0.66
<i>Haemagogus (Conopostegus) leucoclaenus</i> (Dyar & Shannon, 1924)	112	171	74	24	86	7			474	4.45
<i>Psorophora (Janthinosoma) albigena</i> (Peryassú, 1908)			1						1	0.01
<i>Psorophora (Janthinosoma) albipes</i> (Theobald, 1907)			74						74	0.69
<i>Psorophora (Janthinosoma) albipes</i> (Theobald, 1907)/ <i>albigena</i> (Peryassú, 1908)/ <i>varipes</i> (Coquillett, 1904)			3						3	0.03
<i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> (von Humboldt, 1819)	8	141	91	4	1	22			267	2.51
<i>Psorophora (Janthinosoma) lanei</i> Shannon and Cerqueira, 1943			1	1		2			4	0.04
<i>Psorophora (Janthinosoma)</i> sp.			4	1					5	0.05
Tribe Culicini	8	26	20		22	12	72	101	261	2.4
<i>Culex (Carrollia)</i> sp.							72	101	173	1.62
<i>Culex (Culex) Declarator</i> Group			2						2	0.02
<i>Culex (Culex) declarator</i> Dyar and Knab, 1906		1							1	0.01
<i>Culex (Culex) nigripalpus</i> Theobald, 1901	3	6	9		2				20	0.19
<i>Culex (Culex)</i> sp.	2	6			7	2			17	0.16
<i>Culex (Melanoconion)</i> sp.					9	7			16	0.15
<i>Culex (Microculex) neglectus</i> Lutz, 1904			1		1				2	0.02
<i>Culex (Microculex) imitator</i> Theobald, 1903			1						1	0.01
<i>Culex (Microculex)</i> sp.							2		2	0.02
<i>Culex</i> sp.	3	11	9		3	1			27	0.25
Tribe Mansonini	1	6	1	6					14	0.1
<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia) albicosta</i> (Peryassú, 1908)	1								1	0.01
<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia) chrysonotum</i> (Peryassú, 1922)			1						1	0.01
<i>Mansonia (Mansonia) titillans</i> (Walker, 1848)		5		6					11	0.10
<i>Mansonia (Mansonia)</i> sp.		1							1	0.01
Tribe Sabethini	1815	2389	426	120	2474	1032	186	156	8598	80.7
<i>Limatus durhamii</i> Theobald, 1901	264	646	31	7	14		49		1011	9.49
<i>Limatus flavisetosus</i> Oliveira Castro, 1935	18	1	1		5		15	8	48	0.45
<i>Limatus pseudomethysticus</i> (Bonne-Wepster & Bonne, 1920)	329		134	4	28				495	4.64
<i>Limatus flavisetosus?</i> Oliveira Castro, 1935	1								1	0.01
<i>Limatus</i> sp.					1				1	0.01
<i>Onirion personatum</i> (Lutz, 1904)	34	93	17	60	31	36	7		278	2.61
<i>Runchomyia (Runchomyia) cerqueirai</i> (Stone, 1944)	25		1		3				29	0.27
<i>Runchomyia (Runchomyia) frontosa</i> (Theobald, 1903)	26	7	47		93	1			174	1.63
<i>Runchomyia (Runchomyia) humboldti</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	28		5		3				36	0.34
<i>Runchomyia (Runchomyia) reversa</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	1								1	0.01
<i>Runchomyia (Runchomyia) theobaldi</i>	2								2	0.02
<i>Runchomyia (Runchomyia)</i> sp.		1				1			2	0.02
<i>Sabethes (Davismyia) petrocchia</i> (Shannon & Del Ponte, 1928)		10		22	4				36	0.34
<i>Sabethes (Peytonulus) aurescens</i> (Lutz, 1905)	21				6				27	0.25
<i>Sabethes (Peytonulus) fabricii</i> Lane & Cerqueira, 1942							19	1	20	0.19
<i>Sabethes (Peytonulus) undosus</i> (Coquillett, 1906)/ <i>fabricii</i> Lane & Cerqueira 1942	90		3		1		6		100	0.94
<i>Sabethes (Peytonulus) hadrognathus</i> Harbach, 1995	1								1	0.01
<i>Sabethes (Peytonulus) identicus</i> Dyar & Knab, 1907	19	1			3	5			28	0.26
<i>Sabethes (Peytonulus)</i> aff. <i>Ignotus</i>	7				1				8	0.08
<i>Sabethes (Peytonulus) soperi</i> Lane & Cerqueira, 1942	166		1				6		173	1.62
<i>Sabethes (Peytonulus) whitmani</i> Lane and Cerqueira, 1942	3								3	0.03
<i>Sabethes (Peytonulus)</i> sp.	1								1	0.01
<i>Sabethes (Sabethes) albiprivus</i> Theobald, 1903	3	7	11		30				51	0.48
<i>Sabethes (Sabethes) batesi</i> Lane & Cerqueira, 1942	1	1							2	0.02
<i>Sabethes (Sabethes) forattinii</i> Cerqueira, 1961		10							10	0.09
<i>Sabethes (Sabethes) purpureus</i> (Theobald, 1907)	3				32	3			38	0.36

Table 1. Cont.

Taxon	Adults						Immature		Total	Ab (%) ¹
	CA	PA	STa	STb	VNa	VNb	CA	VNA		
<i>Sabethes (Sabethinus) intermedius</i> (Lutz, 1904)	2		1						3	0.03
<i>Sabethes (Sabethinus) melanonymphe</i> Dyar, 1924	3	1							4	0.04
<i>Sabethes (Sabethinus) xhyphydes</i> Harbach, 1994	1	1	1						3	0.03
<i>Sabethes (Sabethoides) chloropterus</i> (von Humboldt, 1819)		33	4						37	0.35
<i>Sabethes</i> sp.	18								18	0.17
<i>Shamoniiana (Shamoniiana) fluviatilis</i> (Theobald, 1903)	46		11		114	36	7	120	334	3.13
<i>Trichoprosopon castroi</i> Lane & Cerqueira, 1942/ <i>similis</i> Lane & Cerqueira, 1942	226		19	6	123	13	1		388	3.64
<i>Trichoprosopon compressum</i> Lutz, 1905	6	1			2	5			14	0.13
<i>Trichoprosopon dilatatum</i> Rondani, 1848	6						64	27	97	0.91
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i> (Lutz, 1905)	35	1	35		52	40	12		175	1.64
<i>Trichoprosopon soaresi</i> Lane & Cerqueira, 1942	6					2			8	0.08
<i>Trichoprosopon</i> sp.	1				1				2	0.02
<i>Wyeomyia (Cruzmyia) dyari</i> Lane & Cerqueira, 1942	36				4				40	0.38
<i>Wyeomyia (Miamiya) codiocampa</i> Dyar & Knab, 1907			1		1	5			7	0.07
<i>Wyeomyia (Miamiya) limai</i>	2				1				3	0.03
<i>Wyeomyia (Miamiya) lutzii</i> (Costa Lima, 1930)	8	1	12	3	48	15			87	0.82
<i>Wyeomyia (Miamiya) oblita</i> (Lutz, 1904)		15							15	0.14
<i>Wyeomyia (Miamiya) sabethae</i> Lane & Cerqueira, 1942	10	11	5	1	2	4			33	0.31
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) antunesi</i> (Lane & Guimarães, 1937)	6								6	0.06
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) bonnei</i> (Lane and Cerqueira, 1942)/ <i>deanei</i> (Lourenço-de-Oliveira, 1983)	6	75			10	43			134	1.26
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) aff. davisi</i>	33	212	17		391	402			1055	9.90
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) edwardsi</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	8	64	19		306	19			416	3.90
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) incaudata</i> (Root, 1928)	78	117	16		301	33			545	5.11
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) pilicauda</i> Root, 1928	20	131			10	10			171	1.60
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) incaudata</i> (Root, 1928)/ <i>pilicauda</i> Root, 1928					154	1			155	1.45
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) muehlensi</i> Petrocchi, 1927	2	39			24	19			84	0.79
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) palmata</i> (Lane & Cerqueira, 1942)		53							53	0.50
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) palmata</i> (Lane & Cerqueira, 1942)/ <i>galvaoui</i> (Correa & Ramalho, 1956)	20	454	12		408	245			1139	10.69
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) theobaldi</i> (Lane & Cerqueira, 1942)		2	3		9	4			18	0.17
<i>Wyeomyia (Phioniomyia) sp.</i>	8	34	8		52	48			150	1.41
<i>Wyeomyia (Prosopelepis) confusa</i> (Lutz, 1905)	1	1			108	40			150	1.41
<i>Wyeomyia (Spilonympha) bourrouli</i> (Lutz, 1905)/ <i>forcipenis</i> Lourenço-de-Oliveira & Silva, 1985	46	212	7	15	8	1			289	2.71
<i>Wyeomyia (Spilonympha) mystes</i> Dyar, 1924	73	135	3	2	84				297	2.79
<i>Wyeomyia (Triamiya) aporonoma</i> Dyar and Knab 1906	38								38	0.36
<i>Wyeomyia (Triamiya) aporonoma</i> Dyar and Knab 1906/ <i>staminifera</i> Lourenço-de-Oliveira, Motta & Castro, 1992	12								12	0.11
<i>Wyeomyia shannoni</i> Lane & Cerqueira, 1942	8								8	0.08
<i>Wyeomyia (Wyeomyia) sp.</i>		1							1	0.01
<i>Wyeomyia</i> sp.	7	18	1		6	1			33	0.31
Total	2007	3170	890	310	2685	1081	258	257	10,658	-
N. Taxa ²	57	44	42	17	47	29	11	5		

¹ Ab (%) = Relative abundance calculated by dividing the number of mosquitoes of one species by the number of mosquitoes of all species $\times 100$. ² Number of taxa sampled at each site.

At least one of the primary YFV vectors in southeast Brazil—*Hg. leucocelaenus* or *Hg. janthinomys/capricornii* (0.66% abundance)—were detected at all six sites. *Hg. janthinomys/capricornii* was not captured at VNb but was present in all four municipalities included in the study (Supplementary Table S2). Species of Sabethini, which are considered to play a role in YFV transmission, were heterogeneously distributed: *Sabethes chloropterus* was found in PA and STa (abundance of 0.35%); *Sa. soperi* was captured at CA and STa (1.62%); and *Sa. albiprivus* (0.48%) was found in all municipalities but was absent at two sites: STb and VNb. Species of the tribe Aedini—potential vectors or naturally infected by YFV—were captured at all six study sites, including *Ae. serratus* (group) (0.90%), *Ps. ferox* (2.51%), *Ae. scapularis* (3.81%, absent only in VNb), and *Ps. albipes* (0.69%, found only in PA). *Ae. albopictus* (2.00%) was found at all sites except VNa. One larva of *Ae. aegypti* was collected at STa (Supplementary Table S2).

The YFV vectors *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys/capricornii*, and *Sa. chloropterus*—were found in both adult sampling procedures but not in immature sampling (Tables 1 and S2). Among them, *Hg. leucocelaenus* was the most abundant in the adult samplings. The average bite frequencies by YFV vectors were 3.33 and 1.42 bites per person/h in adult sampling 1 and 2, respectively (Table 2). The highest bite frequencies were recorded in CA (6.47), STb (3.23), and PA (2.81), all during adult sampling 1.

Table 2. Biting frequency of YFV vector species in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, from February to June 2017.

Sampling Effort ¹ (h)	Adults Sampling ¹							Adults Sampling ²												
	CA		PA		STa		STb	VNa		VNb		Total	PA		VNa		Total			
	60		42		50.5		13	52		33		250.5	97		66		163			
Species	N ²	BF ³	N	BF	N	BF	N	BF	N	BF	N	BF	N	BF	N	BF	N	BF		
<i>Hg. leucocelaenus</i>	112	1.87	104	2.48	74	1.47	24	1.85	18	0.35	7	0.21	339	1.35	67	0.69	68	1.03	135	0.83
<i>Hg. janthinomys/capricornii</i>	10	0.17	2	0.05	7	0.14	17	1.31	1	0.02		37	0.15	19	0.20	14	0.21	33	0.20	
<i>Sa. chloropterus</i>			12	0.29	4	0.08						16	0.06	21	0.22		0.00	21	0.13	
<i>Ae. aureolineatus</i>	35	0.58			17	0.34	1	0.08	23	0.44		76	0.30		6	0.09	6	0.04		
<i>Sa. identicus</i>	19	0.32						2	0.04	5	0.15	26	0.10	1	0.01	1	0.02	2	0.01	
<i>Sa. soperi</i>	166	2.77			1	0.02						167	0.67				0	0.00		
<i>Sh. fluviatilis</i>	46	0.77			11	0.22			80	1.54	36	1.09	173	0.69		34	0.52	34	0.21	
TOTAL	388	6.47	118	2.81	114	2.26	42	3.23	124	2.38	48	1.45	834	3.33	108	1.11	123	1.86	231	1.42

¹ Sampling effort = total number of sampling hours; ² N = number of captured adults; ³ BF = Biting frequency, the number of mosquitoes attempting to feed on one person per hour.

The most abundant mosquito species at each study site during adult sampling 1 are shown in Figure 3. Unlike at the other study sites where Sabethini mosquitoes prevailed, Aedini mosquitoes were among the most abundant in ST (STa and STb), and also where the traditional primary YFV vectors were most abundant, totaling 13.23% of the mosquitoes collected.

Although the species richness and diversity (Shannon-Weaver diversity index) at PA and VNa changed only slightly between adult sampling 1 and 2, the dominant species varied markedly (Supplementary Table S2). *Wy. palmata/galvaoi* was the most abundant species at both sites during adult sampling 2 (Figure 4): 21.01% in PA and 19.77% in VNa. Other species of the subgenus *Phoniomyia*, including *Wy. aff. davisii*, *Wy. pilicauda*, *Wy. incaudata*, and *Wy. edwardsi* were also comparatively abundant at both sites. In PA, *Hg. leucocelaenus*, *Sa. chloropterus*, and *Hg. janthinomys/capricornii* comprised 3.46%, 1.08%, and 0.98% of the species, respectively. In VNa, *Hg. leucocelaenus* accounted for 3.66% of the species (Figure 4), whereas *Hg. janthinomys/capricornii* accounted for only 0.75%.

Li. durhamii, *Wy. mystes*, *Wy. bourrouli/forcipenis*, and *Ae. scapularis* were significantly more abundant at ground level (Supplementary Table S3). In contrast, *Hg. janthinomys/capricornii* and *Wy. edwardsi* prevailed in forest canopies. There was no significant difference in abundance between canopy and ground collections for the other species whose total collected allowed the analysis.

In immature samples, *Culex* (Car.) spp. (27.91%), *Tr. digitatum* (24.81%), and *Li. durhamii* (18.99%) were the most abundant in CA, whereas *Sh. fluviatilis* (46.69%), *Culex* (Car.) spp. (39.30%), and *Tr. digitatum* (10.51%) were the most abundant in VNa (Figure 5).

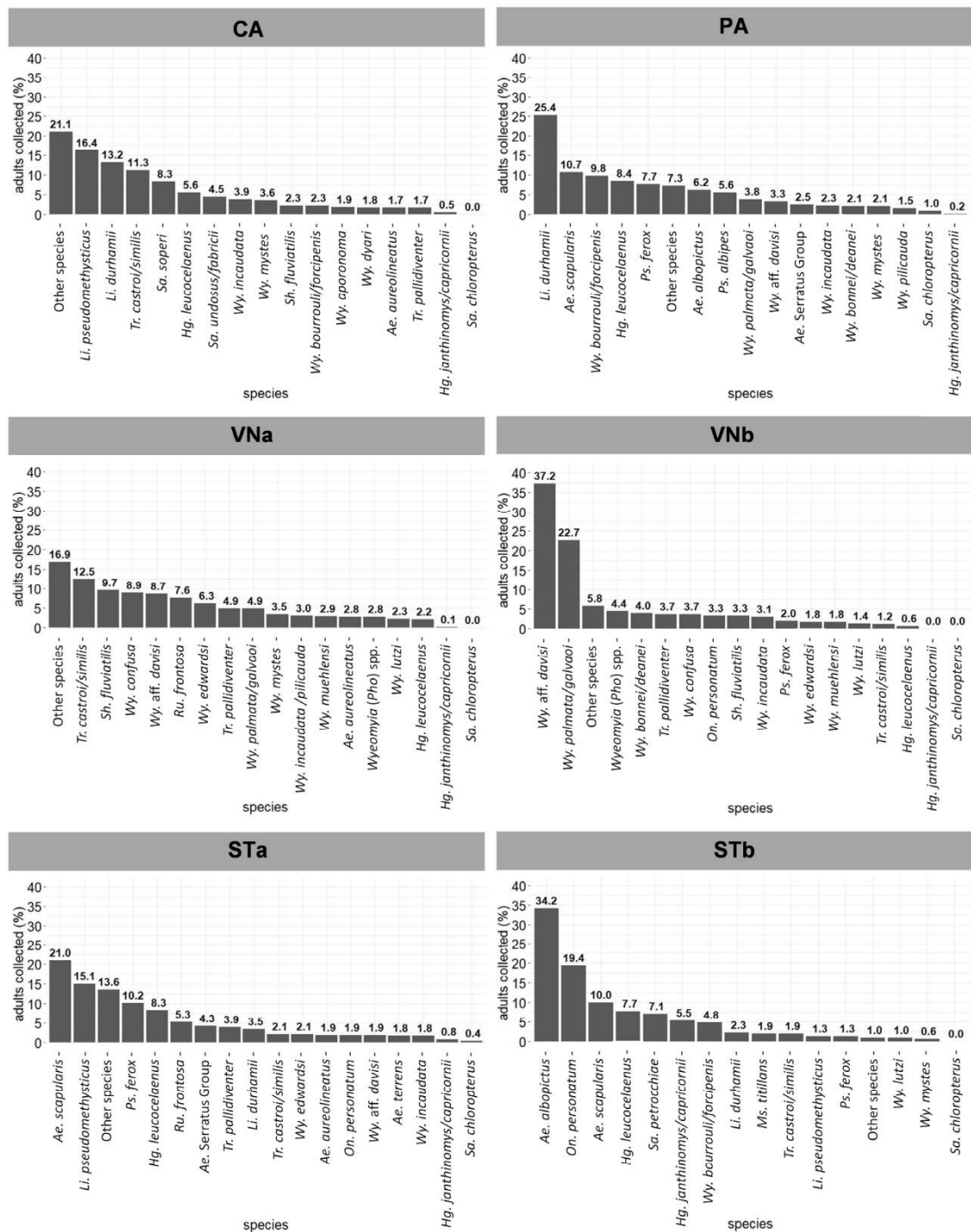


Figure 3. Most common mosquito species in adult sampling 1 in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, February 2017.

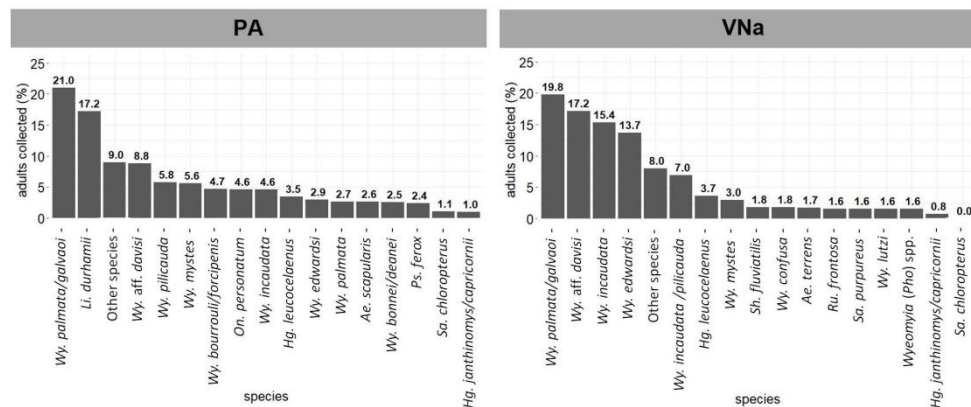


Figure 4. Most common mosquito species in adult sampling 2 in Pancas (PA) and Venda Nova do Imigrante (VNa), Espírito Santo, from March to June 2017.

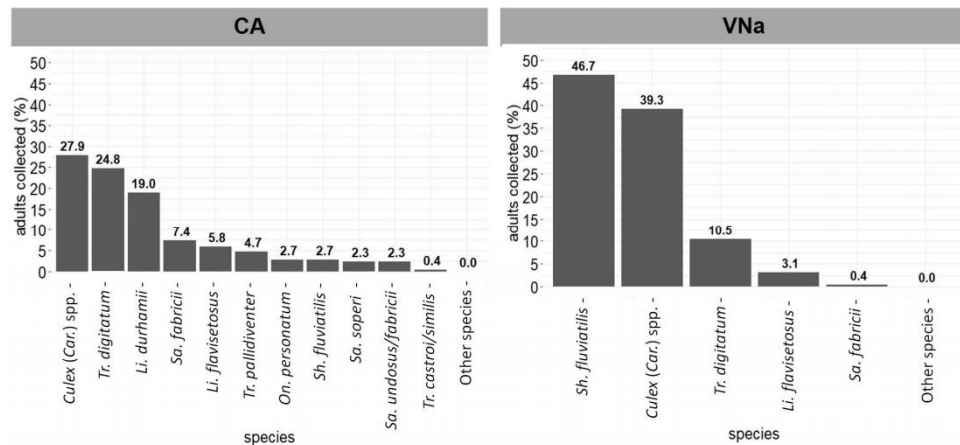


Figure 5. Mosquito species (in decreasing order of abundance) found in immature sampling in Cariacica (CA) and Venda Nova do Imigrante (VNa), Espírito Santo, from April to June 2017.

3.2. Detection of Natural Infection by YFV

We tested a total of 963 pools comprising 6712 mosquitoes. All *Aedini* and *Sabethes* were tested, as well as the most abundant species belonging to other genera of Sabethini were collected during the peak transmission (Supplementary Table S4).

Infections were detected at all study sites during adult sampling 1. In contrast, no positive sample was detected in adult sampling 2 and immature sampling.

We detected 19 YFV-positive pools of seven species. Considering the total collected in the six sampling sites, their MIR in descending order were: *Sa. chloropterus* (MIR = 62.5, MLE = 43.6), *Hg. janthinomys/capricornii* (MIR = 54.1, MLE = 35.8), *Sa. identicus* (MIR = 38.5, MLE = 26.4), *Hg. leucocelaenus* (MIR = 32.5, MLE = 32.1), *Ae. aureolineatus* (MIR = 14.3, MLE = 8.7), *Sa. soperi* (MIR = 12.3, MLE = 12.1), and *Sh. fluviatilis* (MIR = 5.9, MLE = 5.4) (Supplementary Table S4).

Infections in *Hg. leucocelaenus* were recorded at all study sites except for PA, regardless of its high abundance. Moreover, *Hg. leucocelaenus* was the only species found to carry YFV in STb and VNa. In contrast, four species were found naturally infected with YFV in CA: *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys/capricornii*, *Sa. identicus*, and *Sa. soperi*. Coincidentally, this was where mosquito sampling started with the shortest time elapsed from the first YFV record in humans or NHPs (2 weeks, Supplementary Table S5). The two YFV-positive pools

detected in PA comprised *Hg. janthinomys/capricornii* and *Sa. chloropterus*. *Ae. aureolineatus* was found to be positive for YFV only in STa (Supplementary Table S4). *Aedes aegypti* captured at STa tested negative, similar to potential or secondary YFV vectors, such as *Ae. albopictus*, *Psorophora* spp., and *Sa. albiprivus*.

The MIR and MLE values varied considerably according to mosquito species and site. The highest infection rates were observed in PA for *Hg. janthinomys/capricornii* (MIR and MLE = 500.00). This species displayed high MLE (129.45) in CA. The lowest infection rates for *Hg. leucocelaenus* were detected in STa (MIR = 13.51, MLE = 13.89), where one positive sample of *Ae. aureolineatus* (MIR = 71.43, MLE = 117.75) was recorded (Table 3). In contrast, the highest MIR and MLE values were observed for *Hg. leucocelaenus* at the two sites of VN (VNa and VNb). There was no linear correlation (Pearson correlation coefficient; $\rho = -0.04$) between MIRs of *Haemagogus* species and the Shannon-Weaver index (H'). The sample size and study design prevented any statistical analysis from comparing mosquito species diversity and MIRs with human or monkey YFV infections in municipalities surveyed during and after the peak of transmission.

Table 3. Rates of YFV natural infection in mosquitoes collected in adult sampling 1 at Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, 2017.

Local	Adults Sampling ¹											
	CA		PA		STa		STb		VNa		VNb	
Species	MIR ¹	MLE ²	MIR	MLE	MIR	MLE	MIR	MLE	MIR	MLE	MIR	MLE
<i>Ae. aureolineatus</i>	0.00	0.00			71.43	117.75	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>Hg. janthinomys/capricornii</i>	100.00	129.45	500.00	500.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>Hg. leucocelaenus</i>	36.04	38.96	0.00	0.00	13.51	13.89	83.33	102.19	166.67	338.45	142.86	276.98
<i>Sa. chloropterus</i>			83.33	91.44	0.00	0.00						
<i>Sa. identicus</i>	52.63	59.25							0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sa. soperi</i>	12.35	12.66			0.00	0.00						
<i>Sh. fluviatilis</i>	0.00	0.00			0.00	0.00			0.00	0.00	27.78	32.02

¹ Minimum infection rate = the number of YFV-positive pools/number of adults tested for this species \times 1000;
² Maximum likelihood estimate per 1000 mosquitoes = $1 - (1 - Y/X)^{1/m}$, where Y is the number of positive pools, X is the total number of pools, and m is the size of each tested pool.

4. Discussion

This study presents the most comprehensive investigation of sylvatic mosquito fauna in terms of the number of study sites and sampling efforts in ES. Mosquito surveys were carried out during the 2017–2019 YFV outbreak in southeast Brazil [7,10,32–34]; however, to the best of our knowledge, this is the only study of a systematic vector collection from the beginning to the end of the transmission period in the same areas. Moreover, our results and previous data [7,35] demonstrate a great diversity of Culicidae species in ES, including several YFV vectors. Notably, our study included the same zone in ES where the first report of YFV transmission without *Ae. aegypti* was described [8].

When the sylvatic YFV outbreak was discovered in Canaan Valley, ST, in March 1932, the peak period of transmission had already passed. The investigations reported 83 suspected cases, with nine deaths from January to March 1932 [3,8]. Curiously, the peak of cases occurred during the same period (January and February) in the 2017 outbreak. A serological investigation made in the early 1930s revealed that 12% of people living near forests had antibodies against YFV and that undiagnosed YFV epizootic waves had crossed those rural areas via the forests in ES before. Canaan Valley was affected again in 1939, with 198 cases recorded in ES [2,3]. These findings indicate that forest areas were considerably receptive to the transmission of YFV. Nevertheless, inexplicably, approximately 80 years passed before the 2017 outbreak. It is likely that unknown ecological changes that occurred during the recent decades facilitated the spread of the virus from the Cerrado biome in MG to this portion of the Atlantic Forest in ES.

In the 1930s, the most common mosquito species found in ST was *Ae. scapularis*, followed by other Aedini species, such as *Psorophora* spp., *Ae. serratus*, and *Ae. terrens*. In the present study, *Ae. scapularis* was the most abundant mosquito found in STa and the third-most abundant in STb. *Psorophora* spp., *Ae. serratus*, and *Ae. terrens* maintained high abundances in 2017 (Figure 3). Intriguingly, *Haemagogus* spp., which was common and widespread in the 2017 samples, was not even recorded in the 1930s. Entomological surveys carried out during the 1932 outbreak could not determine the vectors, and other hematophagous insects besides mosquitoes, such as sand flies, were also suspected [3,8]. The role of *Ae. scapularis* as a secondary YFV vector was much later suggested in other Brazilian areas [5,7,36]. The primary role of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. capricornii* as vectors and the potential of undetermined Sabethini species in YFV transmission were first described in the Paraíba do Sul River basin in RJ [3,37]. Thus, the YFV vectors in ES, particularly where sylvatic yellow fever was first described, remain to be elucidated.

Mosquito species composition is affected by climate, environmental conditions, and landscape topography [20,33,38,39]. Therefore, we surveyed six YFV foci located at altitudes ranging from 170 m to 1140 m in three river basins (Itapemirim, Doce, and Coastal), representing distinct vegetation structures, rainfall, and temperature.

When data on biting frequency, abundance, and YFV infection rates in 2017 are considered, the role of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys/capricornii* as primary vectors becomes evident. Although they presented distinct biting frequencies, *Hg. leucocelaenus* was detected in all study sites and was the most abundant vector species in four of them. One person was exposed to approximately two bites of *Hg. leucocelaenus* per hour during the daytime in all areas except for the two high-altitude VN sites. However, low biting frequencies in the VN sites were compensated for by high infection rates, that is, half or more of *Hg. leucocelaenus* pools were positive for the YFV (Table 3 and Table S4). These features reinforce its role as a primary vector, as vectorial capacity is influenced by abundance, biting frequencies, and infection rates.

Hg. leucocelaenus is distributed throughout Brazil and has been recorded in several municipalities of ES [7,19,35,40]. In this study, it was detected at all study sites at both the tree canopy and ground levels, consistent with previous results [41,42]. The vertical movement of *Hg. leucocelaenus* inside and near the epizootic forest would favor the transmission of YFV from infected NHPs to humans.

Hg. janthinomys/capricornii was significantly more abundant in the tree canopy, as expected [43,44]. This species has been recognized for decades as the primary vector of YFV in South America, especially in the Amazon, where it is much more abundant than *Hg. leucocelaenus* [37,44–47]. Outside of the Amazon, such as in Rio Grande do Sul (where important YFV outbreaks occurred in 2003, 2008–2009, and 2020–2021), *Hg. janthinomys/capricornii* does not occur, and *Hg. leucocelaenus* has been considered to be the primary vector [6,48]. *Hg. janthinomys/capricornii* exhibited high infection rates in two sites. *Hg. leucocelaenus* had high abundance and biting rates and was detected in five of the six study sites. For instance, in PA *Hg. leucocelaenus* was quite frequent but was not found infected, whereas one of the two captured *Hg. janthinomys/capricornii* were detected infected during the transmission peak. Therefore, the co-occurrence of *Hg. janthinomys/capricornii* and *Hg. leucocelaenus* was certainly a key factor promoting YFV transmission in the 2017 outbreak in ES, as well as elsewhere in Southeast Brazil in 2017–2019 [7,10,32].

YFV infections were detected in five other mosquito species, including *Sa. identicus*, *Ae. aureolineatus*, *Sh. fluviatilis*, *Sa. soperi*, and *Sa. chloropterus*. However, all of these species were detected at sites where the primary vectors (*Haemagogus*) were also found to harbor the virus. In contrast to *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys/capricornii*, these five species had a more limited distribution, exhibited lower abundance and bite frequency, and natural infection was recorded in only one of the six sites with usually low MIR and MLE. These features suggest a secondary, local, or momentary role in transmission for these species. This was the case with *Sa. identicus*, *Ae. aureolineatus*, and *Sh. fluviatilis*. Their natural infection with YFV was detected for the first time in this study. *Sa. soperi* was once detected

infected in the Cerrado [46,49], and *Sa. chloropterus* was recorded as infected several times across the Americas, including the Atlantic Forest [7,45,46,50]. *Sh. fluviatilis* and any other *Shannoniana* species have never been associated with any arbovirus transmission cycle [46,49]. Although *Ae. aureolineatus* and *Sa. identicus* belong to genera commonly involved in YFV transmission, the vector competence for YFV of these two species and *Sh. fluviatilis* has never been assessed. From our analysis, we do not know whether these species are capable of transmitting the virus or if the infection is restricted to the primary tissue of viral replication (the stomach) because the pools include the entire mosquito body. In any case, ecological and environmental conditions may explain the detection of YFV infections in a greater diversity of mosquito species. The YFV epizootic wave of 2017 quickly infected thousands of naïve NHPs. Dying or very sick viremic NHPs usually tend to descend to low forest strata or lie lethargic on the ground, where they provide mosquitoes of several species with an ideal opportunity for infection [51]. This scenario could likely occur at the CA site with the largest and most preserved fragment of the Atlantic rain forest sampled here, which exhibited great richness (57 taxa) and high levels of natural infection in *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys/capricornii*, *Sa. soperi*, and *Sa. identicus*.

In January 2017, the YFV spread from Minas Gerais through the Rio Doce and Rio Itapemirim basins and occupied a large part of the forest fragments in only a few weeks [11]. A large number of human and NHP cases [9,18], as well as the rapid spread across ES (Figure 1), illustrated the high sensitivity of this area at the time. This was probably due to the abundance of both competent primary vectors and susceptible NHPs under favorable environmental and climatic conditions (during the rainy season).

The rapid spread of the epizootic wave leading to the death or immunization of NHPs also helps explain the short period of virus circulation in ES. Records of YFV circulation, whether in humans or NHPs, were recorded at all study sites until the first half of March 2017 (Figure 2). Due to this pattern, epizootic YFV waves in the extra-Amazon area have been compared to “fires” that consume themselves and rarely return or remain in recently affected areas, in which future epizootics will depend on viral reintroduction from a new wave initiated in the Amazon, the endemic area. [2,11,51,52]. This could explain why the YFV-positive mosquito pools were detected only at adult sampling 1 (during the 6th–9th EWs), at the peak of YFV transmission. No YFV-positive mosquito was recorded during adult sampling 2 (March to June 2017), even in the forest canopy—the preferred habitat of the primatophilic primary vectors. The absence of the YFV in mosquitoes that emerged from ovitraps (operated from April–June 2017) and in the adult sampling 2 further confirms that virus transmission occurred at a low frequency or had apparently been interrupted. It is important to note that none of the immature mosquitoes collected were primary vectors of YFV, and only one secondary vector (*Sa. soperi*) was collected.

Phylogeographic analyses of YFV transmission in Southeast Brazil suggested an average velocity of 0.12 km/d [53] and 0.5 km/d [11]. The arrival and peak of human cases and NHP deaths in ES occurred in the summer of 2017 (January to early March). Epizootics were first recorded in Ibatiba, western ES, in the 1st EW of 2017 (Figure 1). Epizootics were first detected in CA, approximately 120 km east of the state, in the 7th EW. This epidemiological data suggest that the speed of YFV transmission in the Atlantic Forest of ES was ~2.9 km/d, similar to the 2.7 km/d obtained with an epidemiological model assessing NHP deaths during the warmer months of the 2017 outbreak in SP [54] and the 3.3 km/d obtained in a phylogeographic analysis of 2017–2018 viral samples from southeast Brazil [55].

Our findings emphasize the need for rapid entomo-virological investigation in case of suspected YFV infections. For example, in PA, where it took six weeks from the first sign of YFV circulation to the beginning of mosquito collections (Supplementary Table S5), no YFV-positive sample was detected in *Hg. leucocelaenus*, even though it was abundant at this site. (Tables 2 and 3). On the other hand, several positive samples of *Hg. leucocelaenus* were found at other sites between the 2nd and 5th weeks after the first suspicion of viral circulation (Tables 3 and S5). Moreover, the highest number of positive pools and YFV-

positive species were recorded two weeks after the first YFV case in CA. It has been suggested that there is a greater chance of collecting infected mosquitoes up to 24 d after the first signs of transmission [7] or 41 d after the last detected YFV case [46]. Thus, the earlier entomological investigations are initiated following the first suspicion of YFV (death of NHPs), the greater the chance of detecting infected mosquitoes and elucidating transmission dynamics, especially in terms of the diversity of mosquitoes involved in viral circulation.

By systematically sampling and screening for natural infections in geographically distinct and topographically heterogeneous localities, we generated an annotated checklist of mosquito species in the state of ES, which can be applied in future studies of arboviruses and other mosquito-related parasites. It also provided an opportunity to train local stakeholders in medical entomology, which could aid in restoring large-scale YFV surveillance in ES and be replicated for future outbreaks. Our study showed that ES remains a highly sensitive area for the circulation of YFV, as the main vector species are abundant and widespread among small- or medium-sized forest fragments to large, well-preserved Atlantic Forest patches at 170 to 1140 m in altitude with distinct climatic regimes. These findings reinforce the importance of maintaining high vaccination coverage in these historically affected areas, in line with the recent Pan American Health Organization guidelines [56]. In this way, mosquito surveillance, combined with the use of new methodologies, such as the modeling of risk areas and applications for monitoring epizootic diseases [51,57], can contribute to improving the surveillance and control of the sylvatic YFV.

5. Conclusions

After extensive sampling, taxonomic identification, and molecular diagnostic efforts, we concluded that *Haemagogus leucocelaenus* and *Hg. janthinomys/capricornii* were the main YFV vectors during the 2017 outbreak due to their higher abundance and YFV infection rates in ES areas. Moreover, other vectors may have a secondary role in transmission, such as *Sabethes chloropterus*, *Sa. soperi*, *Sa. identicus*, *Aedes aureolineatus*, and *Shannoniana fluviatilis*, as they were also found naturally infected. The study emphasizes the importance of monitoring mosquito communities in the Atlantic Forest and maintenance of high vaccination coverage in receptive areas to YFV transmission.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14122805/s1>, Table S1: Number of adults and immature mosquitoes collected during the entomological surveys from February to June 2017 in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo; Table S2: Number and percentage of adult mosquitoes belonging to the Aedini and Sabethini tribes (along with their potential role in yellow fever transmission¹) collected in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, before and after the peak of the epidemic (Adult sampling 1 and 2) from February to June 2017; Table S3: Mosquito species found at ground and canopy levels during adult sampling 2 in Pancas (PA) and Venda Nova do Imigrante (VNa), Espírito Santo, from March to June 2017; Table S4: Mosquito species tested for natural infection by the YFV in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb) from February to June 2017; Table S5: Number of YFV-positive mosquito pools correlated with the time elapsed between the first YFV record and the date of adult sampling 1 in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, 2017.

Author Contributions: Conceptualization: A.F. and R.L.-d.-O.; Data curation, L.M.d.A.S., R.S.E., F.V.S.d.A., A.F. and R.L.-d.-O.; Formal Analysis, L.M.d.A.S., R.S.E., F.V.S.d.A., A.F. and R.L.-d.-O.; Funding Acquisition, A.F.-d.-B. and R.L.-d.-O.; Investigation, L.M.d.A.S., M.d.A.M., A.C.N.-P., A.F.-d.-B., M.S.A.S.N., G.R.P. (Gláucio Rocha Pereira), G.R.P. (Glauber Rocha Pereira), C.B.d.S., I.d.S.P., Á.A.F.-M., K.R.L.J.C. and A.F.; Methodology, L.M.d.A.S., A.F. and R.L.-d.-O.; Project administration, L.M.d.A.S., A.F. and R.L.-d.-O.; Resources, L.M.d.A.S., M.d.A.M., K.R.L.J.C., A.F. and R.L.-d.-O.; Supervision, L.M.d.A.S., A.F. and R.L.-d.-O.; Validation, L.M.d.A.S., M.d.A.M., A.F. and R.L.-d.-O.; Visualization, L.M.d.A.S., M.d.A.M., R.S.E., F.V.S.d.A., C.R.V., A.F. and R.L.-d.-O.; Writing—original draft, L.M.d.A.S., M.d.A.M.,

R.S.E., F.V.S.d.A., A.F. and R.L.-d.-O.; Writing—review & editing, L.M.d.A.S., M.d.A.M., R.S.E., F.V.S.d.A., A.C.N.-P., A.F.-d.-B., M.S.A.S.N., G.R.P. (Gláucio Rocha Pereira), G.R.P. (Glauber Rocha Pereira), C.B.d.S., I.d.S.P., C.R.V., Á.A.F.-M., K.R.L.J.C., A.F. and R.L.-d.-O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number CNPq-312446/2018; Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, grant numbers E-26/203.064/2016, E-26/202.431/2019, E-26/201.335/2016; and Vale (Brasil), grant number Vale-202002387-000001.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Teresa Fernandes Silva do Nascimento and Nildimar Honório Rocha for suggestions and encouragement; Heloisa Diniz for preparing Figure 1; Rosalainy Surubi Fernandes, Alexandre da Silva Xavier, Steeven Rios Ribeiro, Maria Ignez Lima Bersot, Cristiane Maria Vicente, Marcelo Quintela, Marcelo Celestino dos Santos, Mauro Menezes Muniz, Renato Carvalho de Andrade (*in memoriam*), Joseane Carneiro Costa and Rogerio Teotonio Araújo for technical support; Laboratório de Estatística/Universidade Federal Fluminense, and the Brazilian Ministry of Health (CGLAB) for laboratory and field work support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Monath, T.P.; Vasconcelos, P.F.C. Yellow Fever. *J. Clin. Virol.* **2015**, *64*, 160–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Possas, C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Tauil, P.L.; Pinheiro, F.D.P.; Pissinatti, A.; Cunha, R.V.; da Freire, M.; Martins, R.M.; Homma, A. Yellow Fever Outbreak in Brazil: The Puzzle of Rapid Viral Spread and Challenges for Immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e180278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Franco, O. *História da Febre Amarela no Brasil*; Ministério da Saúde, Departamento Nacional de Endemias Rurais: Rio de Janeiro, Brazil, 1969; Volume 1.
4. Abreu, F.V.S.; Ferreira-De-Brito, A.; de Souza Azevedo, A.; Linhares, J.H.R.; de Oliveira Santos, V.; Miranda, E.H.; Neves, M.S.A.S.; Yousfi, L.; Ribeiro, I.P.; dos Santos, A.A.C.; et al. Survey on Non-Human Primates and Mosquitoes Does Not Provide Evidences of Spillover/Spillback between the Urban and Sylvatic Cycles of Yellow Fever and Zika Viruses Following Severe Outbreaks in Southeast Brazil. *Viruses* **2020**, *12*, 364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vasconcelos, P.F.C.; Rosa, A.P.A.T.; Rodrigues, S.G.; Rosa, E.S.T.; Monteiro, H.A.O.; Cruz, A.C.R.; Barros, V.L.R.S.; Souza, M.R.; Rosa, J.F.S.T. Yellow Fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998–1999: Entomologic and Epidemiologic Findings. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 565–569. [[PubMed](#)]
6. Cardoso, J.D.C.; de Almeida, M.A.B.; dos Santos, E.; da Fonseca, D.F.; Sallum, M.A.M.; Noll, C.A.; Monteiro, H.A.d.O.; Cruz, A.C.R.; Carvalho, V.L.; Pinto, E.v.; et al. Yellow Fever Virus in *Haemagogus Leucocelaenus* and *Aedes Serratus* Mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1918–1924. [[CrossRef](#)]
7. de Abreu, F.V.S.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-de-Brito, A.; dos Santos, A.A.C.; de Miranda, R.M.; Bonnelly, I.D.S.; Neves, M.S.A.S.; Bersot, M.I.; dos Santos, T.P.; Gomes, M.Q.; et al. *Haemagogus Leucocelaenus* and *Haemagogus Janthinomys* Are the Primary Vectors in the Major Yellow Fever Outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes. Infect.* **2019**, *8*, 218–231. [[CrossRef](#)]
8. Soper, F.L.; Penna, H.; Cardoso, E.; Serafim, J.; Frobisher, M.; Pinheiro, J. Yellow Fever without *Aedes Aegypti*. Study of a Rural Epidemic in the Valle Do Chanaan, Espirito Santo, Brazil, 1932. *Am. J. Epidemiol.* **1933**, *18*, 555–587. [[CrossRef](#)]
9. Fernandes, N.C.C.d.A.; Cunha, M.S.; Guerra, J.M.; Réssio, R.A.; Cirqueira, C.D.S.; D’Andretta Iglezias, S.; de Carvalho, J.; Araujo, E.L.L.; Catão-Dias, J.L.; Díaz-Delgado, J. Outbreak of Yellow Fever among Nonhuman Primates, Espirito Santo, Brazil, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2038–2041. [[CrossRef](#)]
10. Cunha, M.S.; da Costa, A.C.; de Azevedo Fernandes, N.C.C.; Guerra, J.M.; dos Santos, F.C.P.; Nogueira, J.S.; D’Agostino, L.G.; Komninakis, S.V.; Witkin, S.S.; Ressoa, R.A.; et al. Epizootics Due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: Viral Dissemination to New Areas (2016–2017). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5474. [[CrossRef](#)]
11. Delatorre, E.; Santos De Abreu, F.V.; Ribeiro, I.P.; Gómez, M.M.; Cunha Dos Santos, A.A.; Ferreira-De-Brito, A.; Alberto Santos Neves, M.S.; Bonnelly, I.; de Miranda, R.M.; Furtado, N.D.; et al. Distinct YFV Lineages Co-Circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1079. [[CrossRef](#)]
12. Ministério da Saúde. *Informe 43—Febre Amarela/2017*; Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Centro de Operações de Emergências em Saúde sobre Febre Amarela: Cuiabá, Brazil, 2017.
13. Ministério da Saúde. *Informe 21—Monitoramento Do Período Sazonal Da Febre Amarela Brasil-2017/2018*; Monitoramento Da Situação Epidemiológica Da Febre Amarela No Brasil: Cuiabá, Brasil, 2018.

14. De Rezende, I.M.; Sacchetto, L.; Munhoz de Mello, É.; Alves, P.A.; Iani, F.C.d.M.; Adelino, T.É.R.; Duarte, M.M.; Cury, A.L.F.; Bernardes, A.F.L.; Santos, T.A.; et al. Persistence of Yellow Fever Virus Outside the Amazon Basin, Causing Epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006538. [CrossRef]
15. Siqueira, P.C.; Maciel, E.L.N.; Catão, R.D.C.; Brioschi, A.P.; da Silva, T.C.C.; do Prado, T.N. Completude Das Fichas de Notificação de Febre Amarela No Estado Do Espírito Santo, 2017. *Epidemiol. Serv. Saúde* **2020**, *29*, e2019402. [CrossRef]
16. Siqueira, P.C.; Catão, R.C.; Gava, C.; Maciel, E.L.N.; Prado, T.N. Difusão Espaço-Temporal Da Febre Amarela Silvestre Em Um Estado Do Sudeste Do Brasil, 2017. *Cad. Saúde Pública* **2021**, *37*, 1–13. [CrossRef]
17. INCAPER—Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural. *Programa de Assistência Técnica e Extensão Rural, PROATER 2020-2023*; INCAPER: Vitoria, Brazil, 2020.
18. Moussallem, T.M.; Gava, C.; Ardisson, K.S.; Marques, C.S.; Graceli, G.C.; Valadares Koski, A.d.P.; Almada, G.L.; da Silva, A.R.; de Jesus, F.A.A.; Rodrigues, G.A.P.; et al. Yellow Fever Outbreak in a Rural-Urban Mixed Community of Espírito Santo, Brazil: Epidemiological Aspects. *Rev. Panam. Salud Pública* **2019**, *43*, 1. [CrossRef]
19. Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária No Brasil*, 1st ed.; Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, Brazil, 1994; ISBN 85-85676-03-5.
20. Couto-Lima, D.; Andreazzi, C.S.; Leite, P.J.; Bersot, M.I.L.; Alencar, J.; Lourenço-De-oliveira, R. Seasonal Population Dynamics of the Primary Yellow Fever Vector *Haemagogus Leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) Is Mainly Influenced by Temperature in the Atlantic Forest, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2020**, *115*, 1–13. [CrossRef]
21. Service, M.W. *Mosquito Ecology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1993.
22. Fay, R.W.; Eliason, D.A. A Preferred Oviposition Site as a Surveillance Method for *Aedes Aegypti*. *Mosq. News* **1966**, *26*, 531–535.
23. Lane, J. *Neotropical Culicidae*; Editora Universidade de São Paulo: São Paulo, Brazil, 1953; Volume 2.
24. Correa, R.R.; Ramalho, G.R. Revisão de *Phonomyia Theobald*, 1903 (Diptera, Culicidae, Sabethini). *Folia Clin. Biol.* **1956**, *25*, 1–176.
25. Forattini, O.P. *Culicidologia Médica Identificação, Biologia, Epidemiologia*; Editora Universidade de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2002; Volume 2.
26. Sallum, M.A.M.; Obando, R.G.; Carrejo, N.; Wilkerson, R.C. Identification Keys to the Anopheles Mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). IV. Adult Females. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 584. [CrossRef]
27. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 24 May 2020).
28. Shannon, C.E.; Weaver, W. *A Mathematical Theory of Communication*; University of Illinois Press: Urbana, IL, USA, 1949; ISBN 13-978-0252725487.
29. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 1st ed.; Springer: New York, NY, USA, 2009.
30. QGIS Team Software QGIS 3.12.2. Available online: https://www.qgis.org/pt_BR/site/ (accessed on 24 May 2020).
31. Belkin, J.N.; Heinemann, S.J.; Page, W.A. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae) XXI. The Culicidae of Jamaica. *Am. Entomol. Inst. Contrib.* **1970**, *6*, 1–458.
32. Pinheiro, G.G.; Rocha, M.N.; de Oliveira, M.A.; Moreira, L.A.; Filho, J.D.A. Detection of Yellow Fever Virus in Sylvatic Mosquitoes during Disease Outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais State, Brazil. *Insects* **2019**, *10*, 136. [CrossRef]
33. Câmara, D.C.P.; Pinel, C.d.S.; Rocha, G.P.; Codeço, C.T.; Honório, N.A. Diversity of Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors in a Heterogeneous Landscape Endemic for Arboviruses. *Acta Trop.* **2020**, *212*, 105715. [CrossRef] [PubMed]
34. Cunha, M.S.; Tubaki, R.M.; de Menezes, R.M.T.; Pereira, M.; Caleiro, G.S.; Coelho, E.; Saad, L.d.C.; Fernandes, N.C.C.d.A.; Guerra, J.M.; Nogueira, J.S.; et al. Possible Non-Sylvatic Transmission of Yellow Fever between Non-Human Primates in São Paulo City, Brazil, 2017–2018. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15751. [CrossRef] [PubMed]
35. Das Virgens, T.M.; Rezende, H.R.; Pinto, I.S.; Falqueto, A. Fauna of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Goytacazes National Forest and Surrounding Area, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Biota Neotrop.* **2018**, *18*, 1–6. [CrossRef]
36. Cunha, M.S.; Faria, N.R.; Caleiro, G.S.; Candido, D.S.; Hill, S.C.; Claro, I.M.; da Costa, A.C.; Nogueira, J.S.; Maeda, A.Y.; da Silva, F.G.; et al. Genomic Evidence of Yellow Fever Virus in *Aedes Scapularis*, Southeastern Brazil, 2016. *Acta Trop.* **2020**, *205*, 105390. [CrossRef] [PubMed]
37. Shannon, R.; Whitman, L.; Franca, M. Yellow Fever Virus in Jungle Mosquitoes. *Science* **1938**, *88*, 110–111. [CrossRef]
38. Wilk-da-Silva, R.; Mucci, L.F.; Ceretti-Junior, W.; Duarte, A.M.R.d.; Marrelli, M.T.; Medeiros-Sousa, A.R. Influence of Landscape Composition and Configuration on the Richness and Abundance of Potential Sylvatic Yellow Fever Vectors in a Remnant of Atlantic Forest in the City of São Paulo, Brazil. *Acta Trop.* **2020**, *204*, 105385. [CrossRef]
39. De Abreu, F.V.S.; de Andreazzi, C.S.; Neves, M.S.A.S.; Meneguete, P.S.; Ribeiro, M.S.; Dias, C.M.G.; de Albuquerque Motta, M.; Barcellos, C.; Romão, A.R.; Magalhães, M.d.A.F.M.; et al. Ecological and Environmental Factors Affecting Transmission of Sylvatic Yellow Fever in the 2017–2019 Outbreak in the Atlantic Forest, Brazil. *Parasites Vectors* **2022**, *15*, 23. [CrossRef]
40. CMN. Coleção de Mosquitos Neotropicais. Available online: <http://cmn.fiocruz.br/catalogue> (accessed on 27 October 2022).
41. Carpenter, S.J.; Galindo, P. Trapido Harold Forest Mosquito Studies in an Endemic YF Area in Panama. *Mosq. News* **1952**, *12*, 156–164.
42. Alencar, J.; de Mello, C.F.; Gil-Santana, H.R.; Guimarães, A.É.; de Almeida, S.A.S.; Gleiser, R.M. Vertical Oviposition Activity of Mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with Emphasis on the Sylvatic Vector, *Haemagogus Leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* **2016**, *41*, 18–26. [CrossRef]

43. Alencar, J.; Morone, F.; de Mello, C.F.; Dégallier, N.; Lucio, P.S.; da Serra-Freire, N.M.; Guimarães, A.É. Flight Height Preference for Oviposition of Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors of Sylvatic Yellow Fever Virus Near the Hydroelectric Reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 791–795. [[CrossRef](#)]
44. Hendy, A.; Hernandez-Acosta, E.; Valério, D.; Mendonça, C.; Costa, E.R.; Júnior, J.T.A.; Assunção, F.P.; Scarpassa, V.M.; Gordo, M.; Fé, N.F.; et al. The Vertical Stratification of Potential Bridge Vectors of Mosquito-Borne Viruses in a Central Amazonian Forest Bordering Manaus, Brazil. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18254. [[CrossRef](#)]
45. Rawlins, S.C.; Hull, B.; Chadee, D.D.; Martinez, R.; Lemaitre, A.; James, F.; Webb, L. Sylvatic Yellow Fever Activity in Trinidad, 1988 & 1989. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1990**, *84*, 142–143.
46. Dégallier, N.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Vasconcelos, P.F.C.; Travassos da Rosa, E.S.; Rodrigues, S.G.; Sá Filho, G.C.; Travassos da Rosa, J.F.S. New Entomological and Virological Data on the Vectors of Sylvatic Yellow Fever in Brazil. *Cienc. Cult.* **1992**, *44*, 136–142.
47. Vasconcelos, P.F.C.; Rodrigues, S.G.; Dégallier, N.; Moraes, M.A.P.; Travassos Da Rosa, J.F.S.; Travassos Da Rosa, E.S.; Mondet, B.; Barros, V.L.R.S.; Travassos Da Rosa, A.P.A. An Epidemic of Sylvatic Yellow Fever in the Southeast Region of Maranhao State, Brazil, 1993–1994: Epidemiologic and Entomologic Findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997**, *57*, 132–137. [[CrossRef](#)]
48. Vasconcelos, P.F.C.; Sperb, F.; Monteiro, H.A.O.; Tortes, M.A.N.; Sousa, M.R.S.; Vasconcelos, H.B.; Mardini, L.B.L.F.; Rodrigues, S.G. Isolations of Yellow Fever Virus from *Haemagogus Leucocelaenus* in Rio Grande Do Sul State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *97*, 60–62. [[CrossRef](#)]
49. Hervé, J.; Dégallier, N.; da Rosa, A. *Instituto Evandro Chagas: 50 Anos de Contribuição Às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical*; Fund, Servo Saúde Pública: Belém, Brazil, 1986; Volume 1.
50. Moraes, M.A.P.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Pinheiro, F.P. An Epidemic of Yellow Fever in Central Brazil, 1972–1973. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *30*, 204–211. [[CrossRef](#)]
51. De Abreu, F.V.S.; Delatorre, E.; dos Santos, A.A.C.; Ferreira-De-Brito, A.; de Castro, M.G.; Ribeiro, I.P.; Furtado, N.D.; Vargas, W.P.; Ribeiro, M.S.; Meneguete, P.; et al. Combination of Surveillance Tools Reveals That Yellow Fever Virus Can Remain in the Same Atlantic Forest Area at Least for Three Transmission Seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2019**, *114*, e190076. [[CrossRef](#)]
52. Taylor, R.M.; da Cunha, J.F. An Epidemiological Study of Jungle Yellow Fever in an Endemic Area in Brazil. Part I. Epidemiology of Human Infections. *Am. J. Trop. Med.* **1946**, *26* (Suppl. S1), 1–21.
53. Giovanetti, M.; de Mendonça, M.C.L.; Fonseca, V.; Mares-Guia, M.A.; Fabri, A.; Xavier, J.; de Jesus, J.G.; Gräf, T.; dos Santos Rodrigues, C.D.; dos Santos, C.C.; et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. *J. Virol.* **2019**, *94*, e01623-19. [[CrossRef](#)]
54. Fioravanti, C. *O Alarme Dos Macacos*; FAPESP: São Paulo, Brazil, 2018.
55. Cunha, M.d.P.; Duarte-Neto, A.N.; Pour, S.Z.; Ortiz-Baez, A.S.; Černý, J.; Pereira, B.B.d.S.; Braconi, C.T.; Ho, Y.L.; Perondi, B.; Sztajnbock, J.; et al. Origin of the São Paulo Yellow Fever Epidemic of 2017–2018 Revealed through Molecular Epidemiological Analysis of Fatal Cases. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20418. [[CrossRef](#)]
56. Pan American Health Organization; World Health Organization. *Epidemiological Alert Yellow Fever*; WHO: Washington, DC, USA, 2022.
57. De Almeida, M.A.B.; dos Santos, E.; Cardoso, J.d.C.; da Silva, L.G.; Rabelo, R.M.; Bicca-Marques, J.C. Predicting Yellow Fever Through Species Distribution Modeling of Virus, Vector, and Monkeys. *EcoHealth* **2019**, *16*, 95–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

File: **Stanzani 2022_Viruses_Supplementary Material**

Manuscript titled:

Back to where it was first described: Vectors of sylvatic yellow fever transmission in the 2017 outbreak in Espírito Santo, Brazil

Corresponding authors:

Luciana Matos de Abreu Stanzani - luciana.abreu@ufes.br

Ricardo Lourenço-de-Oliveira - lourenco@ioc.fiocruz.br

Supplementary Table S1. Number of adults and immature mosquitoes collected per sampling method and time from February to June 2017 in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo.

Sampling	Sampling Method	Cronology	Level in the forest	Site	EW ¹ when the 1 st YFV was recorded	Number of mosquitoes collected per site	Total Number of collected mosquitoes
Adults 1	PHA ²	February/ 2017 (6 th - 9 th EW)	Ground	VNa	3 rd	829	6350
				VNb	3 rd	1081	
				STa	3 rd	890	
				STb	3 rd	310	
				CA	7 th	2007	
				PA	2 nd	1233	
Adults 2	PHA	March to June/2017 (11 th - 26 th EW)	Ground and Canopy	VNa	3 rd	1856	3793
				PA	2 nd	1937	
Imma- ture	Ovitrap ³	April to June/2017 (19 th - 22 nd)		VNa	3 rd	257	515
				CA	7 th	258	
Total							10658

¹EW = Epidemiological week; ²PHA = Protected Human Attraction; ³Ovitrap = Traditional ovitraps and bamboo traps.

Supplementary Table S2. Adult mosquitoes belonging to the Aedini and Sabethini tribes with potential role in yellow fever transmission¹ collected in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, during and after the peak of the epidemic (Adult samplings 1 and 2) from February to June 2017.

Species	Adult Sampling 1 (AS1)								Adult Sampling 2 (AS2)				AS1 + AS2 + Immature Sampling							
	CA	PA	STa	STb	VNa	VNb	Total	Ab (%) ³	PA	VNa	Total	Ab (%) ³	CA	PA	STa	STb	VNa	VNb	Total	Ab (%) ³
<i>Hg. leucocelaenus</i>	112	104	74	24	18	7	339	5.34	67	68	135	3.56	112	171	74	24	86	7	474	4.45
<i>Ae. scapularis</i>	2	132	187	31	2		354	5.57	51	1	52	1.37	2	183	187	31	3		406	3.81
<i>Sh. fluviatilis</i>	46		11		80	36	173	2.72		34	34	0.90	53		11		234	36	334	3.13
<i>Ps. ferox</i>	8	95	91	4		22	220	3.46	46	1	47	1.24	8	141	91	4	1	22	267	2.51
<i>Ae. albopictus</i>	7	77	4	106		1	195	3.07	18		18	0.47	7	95	4	106		1	213	2.00
<i>Sa. soperi</i>	166		1				167	2.63				0.00	172		1				173	1.62
<i>Ae. Serratus</i> Group	2	31	38	1	2	1	75	1.18	21		21	0.55	2	52	38	1	2	1	96	0.90
<i>Ae. aureolineatus</i>	35		17	1	23		76	1.20		6	6	0.16	35		17	1	29		82	0.77
<i>Ps. albipes</i>		69					69	1.09	5		5	0.13		74					74	0.69
<i>Hg. janthinomys/capricornii</i>	10	2	7	17	1		37	0.58	19	14	33	0.87	10	21	7	17	15		70	0.66
<i>Sa. albiprivus</i>	3		11		17		31	0.49	7	13	20	0.53	3	7	11		30		51	0.48
<i>Sa. chloropterus</i>		12	4				16	0.25	21		21	0.55		33	4				37	0.35
<i>Sa. identicus</i>	19				2	5	26	0.41	1	1	2	0.05	19	1			3	5	28	0.26
<i>Ae. aegypti</i>			1				1	0.02				0.00			1				1	0.01
<i>Sabethes</i> spp. ⁴	151	2	5	22	7	3	190	2.99	21	37	58	1.53	176	23	5	22	45	3	274	2.57
Subtotal	561	524	451	206	152	75	1969	31.00	277	175	452	11.91	599	801	451	206	448	75	2580	24.21
Other species	1446	709	439	104	677	1006	4381	68.99	1660	1681	3341	88.08	1666	2369	439	104	2494	1006	8078	75.79
Total	2007	1233	890	310	829	1081	6350		1937	1681	3793		2265	3170	890	310	2942	1081	10658	
Shannon-Weaver index	1.35	1.15	1.24	0.91	1.33	0.97	1.51		1.19	1.11	1.26		1.38	1.24	1.24	0.91	1.33	0.97	1.50	

¹Mosquitoes species found naturally infected with YFV in previous studies and/or in this survey or demonstrated to be competent to transmit the virus experimentally. ²Total of mosquitoes (adults and immatures) collected with all sampling methods and time. ³Ab (%) = Relative abundance calculated by dividing the number of mosquitoes of one species by the number of mosquitoes of all species × 100. ⁴Other species of genus *Sabethes*.

Supplementary Table S3. Mosquito species found at ground and canopy levels during adult sampling 2 in Pancas (PA) and Venda Nova do Imigrante (VNa), Espírito Santo, from March to June 2017.

Species	Level	PA					VNa					Total	pValue ¹	
		March	April	May	June	Subtotal	March	April	May	June	Subtotal			
<i>Wy. palmata/galvaoi</i>	Canopy	45	114	83	121	363	34	17	49	9	109	472	774	0.1275
	Ground	11	7	13	13	44	186	23	39	10	258	302		
<i>Wy. aff. davisii</i>	Canopy	14	50	31	63	158	61	24	42	15	142	300	490	0.0659
	Ground	6	1	3	3	13	112	21	39	5	177	190		
<i>Wy. incaudata</i>	Canopy	16	13	18	15	62		102	55	62	219	281	374	0.0651
	Ground	8	6	6	7	27	14	13	26	13	66	93		
<i>Hg. leucocelaenus</i>	Canopy	3	5	1	46	55	29	5	6		40	95	135	0.6698
	Ground	5			7	12	5	14	9		28	40		
<i>On. personatum</i>	Canopy	4	11	15	4	34				2	2	36	104	0.2875
	Ground	13	18	11	13	55	11		1	1	13	68		
<i>Wy. edwardsi</i>	Canopy	10	27	14	2	53	33	104	69	21	227	280	311	0.0080
	Ground	2	2			4		3	22	2	27	31		
<i>Li. durhamii</i>	Canopy	1				1				0	5	1	338	0.0092
	Ground	226	40	35	31	332		3		2	5	337		
<i>Wy. mystes</i>	Canopy	1	2			3		3		2	5	8	164	0.0008
	Ground	36	16	41	13	106	12	6	20	12	50	156		
<i>Wy. pillicauda</i>	Canopy	15	16	39	38	108		1	4		5	113	122	0.1470
	Ground	1	1	1	1	4		2	3		5	9		
<i>Wy. incaudata/pillicauda</i>	Canopy						129				129	129	129	0.3816
	Ground					0					0	0		
<i>Wy. bourrouli/forcipenis</i>	Canopy		3	4		7					0	7	95	0.0433
	Ground	45	13	14	12	84	1	3			4	88		
<i>Ae. scapularis</i>	Canopy										0	0	52	0.0325
	Ground	32	8		11	51				1	1	52		
<i>Wy. bonnei/deanei</i>	Canopy	8	13	16	7	44	1				1	45	54	0.1601
	Ground	4	1			5	4				4	9		
<i>Ps. ferox</i>	Canopy										0	0	47	0.0764
	Ground	44			2	46	1				1	47		

<i>Wy. palmata</i>	Canopy	11	4	6	29	50	52				0	0	50	52	0.0847
	Ground			2		2					0	0	2		
<i>Hg. janthinomys/capricornii</i>	Canopy	4	4		11	19	19	9	3	2	14	14	33	33	0.0045
	Ground										0		0		
<i>Wy. muehlensi</i>	Canopy						38				0	0	0	38	0.1709
	Ground	7	31			38					0		38		
<i>Wyeomyia (Pho.) spp.</i>	Canopy	3		10	3	16	25	1	1	1	3	29	19	54	0.2181
	Ground	2	4	2	1	9		15	1	2	8	26	35		
<i>Ru. frontosa</i>	Canopy						5				5	30	5	35	N/A
	Ground	3		2		5		11	2	6	6	25	30		
<i>Sh. fluviatilis</i>	Canopy						0				0	34	0	34	N/A
	Ground						0	26	3	2	3	34	34		
<i>Wy. confusa</i>	Canopy						0				0	34	0	34	N/A
	Ground						0	7	12	7	8	34	34		
<i>Ae. terrens</i>	Canopy						1	5	4	4	13	32	13	33	N/A
	Ground	1				1		5	5	8	1	19	20		
<i>Sa. purpureus</i>	Canopy						0	12	4	4	5	25	25	29	N/A
	Ground						0		1	1	2	4	4		
<i>Wy. lutzi</i>	Canopy						0	11	4		6	21	21	29	N/A
	Ground						0	2	2	2	2	8	8		
<i>Ae. Serratus Group</i>	Canopy						21				0	0	0	21	N/A
	Ground	19			2	21					0	0	21		
<i>Sa. chloropterus</i>	Canopy	4	7	6	1	18	21				0	0	18	21	N/A
	Ground	3				3					0	0	3		
<i>Sa. albiprivus</i>	Canopy		2	1	3	6	7	3	3	3	9	13	15	20	N/A
	Ground			1		1		1	2	1	4		5		
<i>Tr. castroi/similis</i>	Canopy						0				0	19	0	19	N/A
	Ground						0	16	3		19		19		
<i>Ae. albopictus</i>	Canopy		1			1	18				0	0	1	18	N/A
	Ground	14		1	2	17					0	0	17		
<i>Li. pseudomethysticus</i>	Canopy						0	2			2	16	2	16	N/A

	Ground					10	1		3	14		14		
<i>Sa. petrocchia</i>	Canopy	1		1		2		10		1		3	13	N/A
	Ground	1	5	2		8			2		2	3	10	
<i>Tr. pallidiventer</i>	Canopy									0		0	11	N/A
	Ground							0		10		11	11	
<i>Sa. forattinii</i>	Canopy		1	5	4	10					0		10	
	Ground										0	0	0	10
<i>Culex</i> spp.	Canopy										0		0	13
	Ground	7		3	1	11		11		1		1	2	13
<i>Culex (Cux.)</i> spp.	Canopy										0		0	7
	Ground	5	1			6		6		1		1	1	7
<i>Wyeomyia</i> spp.	Canopy										0		0	6
	Ground	1	1	2		4		4		1		1	2	6
<i>Ma. titillans</i>	Canopy										0		0	5
	Ground	5				5		5			0	0	0	5
<i>Ps. albipes</i>	Canopy										0		0	5
	Ground	4	1			5		5			0	0	0	5
<i>Cx. neglectus</i>	Canopy			1		1		1			0		1	2
	Ground								1		1	1	1	1
<i>Cx. nigripalpus</i>	Canopy								1		1		1	2
	Ground			1		1		1			0	1	1	1
<i>Sa. identicus</i>	Canopy									1		1	1	2
	Ground	1				1		1			0	1	1	1
<i>Cx. declarator</i>	Canopy										0		0	1
	Ground			1		1		1			0	0	1	1
<i>Cx. imitator</i>	Canopy			1		1		1			0		0	1
	Ground										0	0	0	1
<i>Mansonia (Man.)</i> sp.	Canopy										0		0	1
	Ground	1				1		1			0	0	1	1
<i>Sa. batesi</i>	Canopy			1		1		1			0		0	1
	Ground										0	0	0	1
<i>Wy. sabetha</i>	Canopy										0		0	1

	Ground	1			1					0		1	
<i>Ae. aureolineatus</i>	Canopy									0		0	
	Ground				0	3		3		6	6	6	6 N/A
<i>Li. flavisetosus</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	2		3		5	5	5	5 N/A
<i>Sa. aurescens</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	3		2		5	5	5	5 N/A
<i>An. cruzii</i>	Canopy				0	3		1		4		4	
	Ground				0					0	4	0	4 N/A
<i>Wy. dyari</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	4				4	4	4	4 N/A
<i>Ru. Cerqueirai</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	2		1		3	3	3	3 N/A
<i>An. laneanus?</i>	Canopy				0	1		1		2		2	
	Ground				0					0	2	0	2 N/A
<i>Anopheles (Ker.) spp.</i>	Canopy				0	1		1		2		2	
	Ground				0					0	2	0	2 N/A
<i>Ae. fulvithorax</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	1				1	1	1	1 N/A
<i>Ru. humboldti</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0			1		1	1	1	1 N/A
<i>Trichoprosopon spp.</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	1				1	1	1	1 N/A
<i>Wy. codiocalpa</i>	Canopy				0	1				1		1	
	Ground				0					0	1	0	1 N/A
<i>Wy. aff. limai</i>	Canopy				0			1		1		1	
	Ground				0					0	1	0	1 N/A
<i>Limatus spp.</i>	Canopy				0					0		0	
	Ground				0	1				1	1	1	1 N/A
Total		648	429	394	466	1937	810	397	437	212	1856	3,79	

¹p-Value calculated using the Mann–Whitney U test with 5% significance ($p < 0.05$); N/A = not applicable.

Supplementary Table S4. Mosquito species tested for natural infection by YFV in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb) from February to June 2017.

Sampling/Local Species	Number of tested pools (Number of positive pools)										Total Tested Pools	Total Positive Pools		
	Adults Sampling 1								Adults Sam- pling 2				Immature Sampling	
	CA	PA	STa	STb	VNa	VNb	MIR ¹	MLE ²	PA	VNa			CA	VNa
<i>Hg. leucocelaenus</i>	23 (4)	22 (0)	16 (1)	5 (2)	5 (3)	2 (1)	32.5	32.1	18 (0)	17 (0)			108	11
<i>Hg. janthinomys/capricornii</i>	2 (1)	2 (1)	2 (0)	5 (0)	1 (0)		54.1	35.8	5 (0)	7 (0)			24	2
<i>Sa. chloropterus</i>		3 (1)	2 (0)				62.5	43.6	7 (0)				12	1
<i>Sa. identicus</i>	4 (1)				2 (0)	2 (0)	38.5	26.4	1 (0)	1 (0)			10	1
<i>Sa. soperi</i>	33 (2)		1 (0)				12.3	12.1			1 (0)		35	2
<i>Ae. aureolineatus</i>	4 (0)		3 (1)	1 (0)	4 (0)		14.3	8.7		3 (0)			15	1
<i>Sh. fluviatilis</i>	5 (0)		1 (0)		9 (0)	4 (1)	5.9	5.4					19	1
<i>Ae. fulvithorax</i>					1 (0)		0	0					1	0
<i>Ae. scapularis</i>	1 (0)	16 (0)	21 (0)	4 (0)	2 (0)		0	0	6 (0)	1 (0)			51	0
<i>Ae. Serratus Group</i>	1 (0)	4 (0)	7 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0	0	4 (0)				19	0
<i>Ae. taeniorhynchus</i>			1 (0)				0	0					1	0
<i>Ae. terreus</i>	1 (0)	2 (0)	3 (0)		4 (0)	1 (0)	0	0	1 (0)	8 (0)			20	0
<i>Ae. aegypti</i>			1 (0)				0	0					1	0
<i>Ae. albopictus</i>	2 (0)	10 (0)	3 (0)	12 (0)		1 (0)	0	0	7 (0)				35	0
<i>Ps. albipes</i>		9 (0)					0	0	2 (0)				11	0
<i>Ps. albipes/albigenu/varipes</i>		2 (0)					0	0					2	0
<i>Ps. ferox</i>	1 (0)	11 (0)	11 (0)	1 (0)		2 (0)	0	0	6 (0)	1 (0)			33	0
<i>Ps. lanei</i>			1 (0)			1 (0)	0	0					2	0
<i>Sa. petrocchiaie</i>				4 (0)	1 (0)		0	0	4 (0)	2 (0)			11	0
<i>Sa. aurescens</i>	5 (0)				1 (0)		0	0		2 (0)			8	0
<i>Sa. fabricii</i>							0	0			4 (0)	1 (0)	5	0
<i>Sa. undosus/fabricii</i>	18 (0)		1 (0)		1 (0)		0	0			1 (0)		21	0
<i>Sa. aff. ignotus</i>	2 (0)						0	0					2	0
<i>Sa. whitmani</i>	2 (0)												2	0
<i>Sa. albiprivus</i>	2 (0)		3 (0)		5 (0)		0	0	4 (0)	6 (0)			20	0
<i>Sa. batesi</i>	1 (0)						0	0	1 (0)				2	0
<i>Sa. forattinii</i>							0	0	2 (0)				2	0
<i>Sa. purpureus</i>	2 (0)				1 (0)	1 (0)	0	0		9 (0)			13	0
<i>Sa. intermedius</i>	1 (0)		1 (0)				0	0					2	0

<i>Sa. melanonymphe</i>	2 (0)	1 (0)					0	0			3	0		
<i>Sa. xhyphydes</i>	1 (0)	1 (0)	1 (0)				0	0			3	0		
<i>Wy. shannoni</i>	2 (0)						0	0			2	0		
<i>Wy. lutzii</i>	1 (0)	1 (0)	3 (0)	1 (0)	4 (0)	2 (0)	0	0			12	0		
<i>Wy. bonnei/deanei</i>	1 (0)	3 (0)			2 (0)	5 (0)	0	0			11	0		
<i>Wy. aff. davisi</i>	3 (0)	5 (0)	4 (0)		7 (0)	42 (0)	0	0			61	0		
<i>Wy. edwardsi</i>	1 (0)	3 (0)	4 (0)		6 (0)	4 (0)	0	0			18	0		
<i>Wy. incaudata</i>	9 (0)	4 (0)	4 (0)		3 (0)	4 (0)	0	0			24	0		
<i>Wy. pillicauda</i>	2 (0)	3 (0)				2 (0)	0	0			7	0		
<i>Wy. incaudata/pillicauda</i>					5 (0)	1 (0)	0	0			6	0		
<i>Wy. palmata/galvaoi</i>	2 (0)	6 (0)	3 (0)		5 (0)	25 (0)	0	0			41	0		
<i>Wy. confusa</i>	1 (0)	1 (0)			9 (0)	4 (0)	0	0			15	0		
<i>Wy. bourrouli/forcipenis</i>	5 (0)	14 (0)	3 (0)	2 (0)	2 (0)	1 (0)	0	0			27	0		
<i>Wy. mystes</i>	7 (0)	5 (0)	3 (0)	1 (0)	5 (0)		0	0			21	0		
<i>Li. durhamii</i>	26 (0)	32 (0)	4 (0)	1 (0)	3 (0)		0	0			66	0		
<i>Li. pseudomethysticus</i>	34 (0)		15 (0)	1 (0)	4 (0)		0	0			54	0		
<i>On. personatum</i>	4 (0)	1 (0)	3 (0)	6 (0)	5 (0)	4 (0)	0	0			23	0		
<i>Ru. frontosa</i>	3 (0)	2 (0)	6 (0)		8 (0)	1 (0)	0	0			20	0		
<i>Tr. castroi/similis</i>	23 (0)		3 (0)	1 (0)	12 (0)	2 (0)	0	0			41	0		
<i>Tr. pallidiventer</i>	4 (0)	1 (0)	5 (0)		6 (0)	5 (0)	0	0			21	0		
Total	241 (8)	164 (2)	139 (2)	46 (2)	124 (3)	117 (2)			68 (0)	57 (0)	6 (0)	1 (0)	963	19

¹Minimum infection rate = number of YFV-positive pools / number of adults tested for this species × 1,000; ²Maximum likelihood estimate per 1,000 mosquitoes = $1 - (1 - Y / X)^{1 / m}$, where Y is the number of positive pools, X is the total number of pools, and m is the size of each tested pool.

Supplementary Table S5. Number of YFV-positive mosquito pools correlated with the time elapsed between the first YFV record and the date of adult sampling 1 in Cariacica (CA), Pancas (PA), Venda Nova do Imigrante (VNa and VNb), and Santa Teresa (STa and STb), Espírito Santo, 2017.

Local	EW ¹ of the 1 st YFV record	EW of collec- tion	Time elapsed between the 1 st YFV record in human or/and NHPs and the begin- ning of mosquito collection date	Number of positive pools
VNa	3 rd	6 th	3 weeks	3
VNb	3 rd	6 th and 7 th	3 weeks	2
PA	2 nd	8 th and 9 th	6 weeks	2
STa	3 rd	8 th	5 weeks	2
STb	3 rd	8 th	5 weeks	2
CA	7 th	9 th	2 weeks	8

¹EW (Epidemiological week, corresponding to the week of the year).

7 CONCLUSÕES

Após extenso levantamento entomológico de Culicidae, identificação taxonômica e diagnóstico molecular de YFV, concluímos que:

Há uma grande diversidade de Culicidae no estado do Espírito Santo, com diferentes composições das comunidades de mosquitos entre os estratos verticais (copa e solo) e entre os pontos de amostragem;

Espécies de vetores do YFV estão distribuídas e abundantes em todas as áreas do estudo em distintas altitudes, paisagens e condições climáticas;

Apontamos *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys/capricornii* como os principais vetores do YFV durante o surto de 2017 no estado do Espírito Santo, devido à sua maior distribuição, abundância e taxas de infecção. A coocorrência dessas duas espécies foi certamente, o fator chave na promoção da transmissão de YFV (2017) no ES e em outras partes da região Sudeste;

Outros vetores podem ter papel secundário na transmissão, como *Sa. chloropterus*, *Sa. soperi*, *Sa. identicus*, *Ae. aureolineatus* e *Sh. fluviatilis*, pois também foram encontrados naturalmente infectados;

A onda epizootica do YFV ocorrida em 2017 no Espírito Santo, dispersou-se rapidamente, alcançando em poucas semanas as florestas do estado. O ápice da circulação viral ocorreu entre os meses de janeiro e fevereiro de 2017, não tendo sido encontradas amostras positivas para YFV em mosquitos coletados a partir do mês de março de 2017 corroborando com os dados epidemiológicos;

A epidemia recente de YFV em Santa Teresa apresentou semelhanças com aquelas ocorridas na década de 1930, tais como, espécies de mosquitos mais encontradas, período do ano em que ocorreram e do ápice de registros de casos, bem como a velocidade de passagem do vírus pela região;

Os resultados do estudo enfatizam a importância do monitoramento das comunidades de mosquitos na Mata Atlântica e da manutenção de altas coberturas vacinais em áreas receptivas à transmissão do YFV.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo apresentou limitações de recursos financeiros e de recursos humanos, dada a urgência que o momento epidemiológico da epidemia de YFV de 2017 exigia e dada a escassez de profissionais da área de entomologia médica no estado do Espírito Santo. Esforços humanos voluntários e recursos financeiros próprios foram empregados para viabilizar em tempo, o levantamento entomológico. A formação de novos profissionais capacitados em entomologia médica mostrou-se claramente necessária para ampliar a pesquisa científica nessa área e colaborar com as ações de vigilância em saúde.

O conhecimento da dinâmica de transmissão da febre amarela silvestre é premente para subsidiar as ações de vigilância entomológica e de epizootias, assim como direcionar procedimentos eficazes para cobertura vacinal para as populações humanas que residem, principalmente, em áreas consideradas de risco para essa arbovirose. Adicionalmente, é recomendável que as intervenções sejam combinadas, integrando o hospedeiro humano, artrópodes vetores e primatas não-humanos, visando a manutenção de estratégias sustentáveis no tempo e que possam reduzir a morbidade e mortalidade da febre amarela silvestre no Brasil.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. V. S. **Febre Amarela e malária: investigação de dois surtos zoonóticos no Sudeste brasileiro**. PhD thesis—Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, jan. 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/43251>. Acesso em: 13 set. 2022.

ABREU, F. V. S. *et al.* Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major Yellow Fever outbreak in Brazil, 2016–2018. **Emerg. Microbes Infect.**, United States, v. 8, n. 1, p. 218–231, 2019. doi: 10.1080/22221751.2019.1568180.

ARAÚJO, F. A. A. *et al.* Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do Vírus da Febre Amarela no Brasil, 2007 a 2009. **Epidemiol. Serv. Saúde (Online)**, v. 20, n. 4, p. 527–536, 2011. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v20n4/v20n4a12.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2022.

ARNELL, J. HAL. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXII. A revision of the genus Haemagogus. **Contributions of the American Entomological Institute**, v. 10, n. 2, p. 1–174, 1973. Disponível em: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Arnell%201973.pdf>. Acesso em: 15 set. 2022.

BARRETT, A. D. T.; HIGGS, S. Yellow Fever: A disease that has yet to be conquered. **Annu. Rev. Entomol.**, United States, v. 52, n. 1, p. 209–229, 2007. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091454.

BARRETT, A. D.; MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of Yellow Fever Virus. Em: **Adv. Virus Res.** United States. n. 61, p. 291-315, 2003. doi: 10.1016/s0065-3527(03)61007-9.

BICCA-MARQUES, J. C. *et al.* The Risks of Yellow Fever to Asian Primates. **Int. J. Primatol.**, United States, v. 43, n. 1, p. 74–91, 1 fev. 2022. doi.org/10.1007/s10764-021-00223-5.

BRASIL. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. Brasília, 2005. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vig_epizootias.pdf. Acesso em: 13 jan. 2023.

BRASIL. **Portaria n.5 da Secretaria de Vigilância em Saúde de 21.2.2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2006. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2006/prt0005_21_02_2006_comp.html. Acesso em: 14 jan. 2023.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, Ministério da Saúde, 2009a. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf. Acesso em: 10 jan. 2023.

BRASIL. **Emergências em saúde pública de importância nacional (ESPIN) de Febre Amarela silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a situação epidemiológica atual no Brasil (2008/2009)**, 2009b. Disponível em: <https://saude.campinas.sp.gov.br/doencas/febre_amarela/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2023.

BRASIL. **Informe 43 - Febre Amarela/2017**. Brasília – DF. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde sobre Febre Amarela, 2017a. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/ms-febre-amarela-170531.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2022.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Emergência epidemiológica de Febre Amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017**. Brasília – DF. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017b. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2020.

BRASIL. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da Febre Amarela**. 2a. ed. Brasília – DF. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2017c. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epizootias_primatas_entomologia.pdf. Acesso em: 10 jan. 2023.

BRASIL. **Informe nº 21. Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil-2017/2018. Monitoramento da situação epidemiológica da Febre Amarela no Brasil**. Brasília – DF. Ministério da Saúde. SUS, 2018. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/informe-fa-21-11abr18-c.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BRASIL. **Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019 - Informe Nº 18**. Brasília – DF. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil--n-18.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico 01 - Situação epidemiológica da Febre Amarela no monitoramento 2019/2020**. Brasília – DF. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde sobre Febre Amarela, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim-epidemiologico-vol-51-no-01>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BRASIL. **Ministério da Saúde reforça importância da vacinação contra a febre amarela**. Brasília – DF. Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/julho/ministerio-da-saude-reforca-importancia-da-vacinacao-contr-a-febre-amarela#:~:text=A%20vacina%20da%20febre%20amarela,forma%20de%20prevenir%20a%20doen%C3%A7a.>>. Acesso em: 6 jan. 2023

BRÈS, P. L. A century of progress in combating Yellow Fever. **Bull. World Health Organ.** Switzerland, v. 64, n. 6, p. 775–86, 1986.

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. T. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. **PLoS Pathog.** United States, v. 3, n. 5, p. 0668–0673, 2007. doi: 10.1371/journal.ppat.0030075. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868956/pdf/ppat.0030075.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2022.

BUGHER, J. C. *et al.* Epidemiology of jungle Yellow Fever in Eastern Colombia. **Am. J. Epidemiol.** Baltimore, v. 39, n. 1, p. 16–51, 1944. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118895.

CÂMARA, F. P. *et al.* Dynamic behavior of sylvatic Yellow Fever in Brazil (1954-2008). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Brasília, v. 44, n. 3, p. 297–299, 29 abr. 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011005000024&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 20 nov. 2022.

CARDOSO, J. DA C. *et al.* Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008. **Emerg. Infect. Dis.** United States, v. 16, n. 12, p. 1918–1924, dez. 2010.

CDC. **Areas with risk of Yellow Fever Virus transmission in South America.** Centers for Disease Control and Prevention, 15 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/index.html>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus Organization, Expression and Replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, United States, v. 44, n.1, p. 649–688, 1990.

CLEMENTS, A. N.; HARBACH, R. E. History of the discovery of the mode of transmission of Yellow Fever Virus. **J. Vector Ecol.**, United States, v. 42, n. 2, p. 208–222, 2017. doi: 10.1111/jvec.12261.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** [Online]. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228p. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/th/pdf/consoli-9788575412909.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2022.

CORREA, R. R.; RAMALHO, G. R. Revisão de *Phoniomyia* Theobald, 1903 (DIPTERA, CULICIDAE, SABETHINI). **Folia Clin. Biol.** São Paulo, v. 25, n. 1-6, p. 1–177, 1956. Disponível em: file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Correa_Ramalho_Phoniomyia.pdf. Acesso em: 10 dez. 2022.

COUTO-LIMA, D. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever Virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Sci. Report.** England, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5501812/pdf/41598_2017_Article_5186.pdf. Acesso em: 10 jan. 2023.

COUTO-LIMA, D. *et al.* Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic Forest, Southeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, n. 6, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/4mcFz88VDVBwSQSdMBX8VMP/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CUNHA, M. S. *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). **Sci. Rep.** England, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-41950-3. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6445104/pdf/41598_2019_Article_41950.pdf. Acesso em: 10 dez. 2022.

DAVIS, N. Susceptibility of Capuchin (*Cebus*) monkeys to Yellow Fever Virus. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 321–334, 1930a. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113835.

DAVIS, N. C. The transmission of Yellow Fever: experiments with the Woolly monkey (*Lagothrix lago-tricha humboldti*), the Spider monkey (*Ateles ater* F. Cuvier), and the Squirrel monkey (*Saimiri sciureus* Linnaeus). **J. Exp. Med.**, v. 51, n. 5, p. 703–720, 1930b. doi: 10.1084/jem.51.5.703. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2131789/pdf/703.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2022.

DAVIS, N. C. The susceptibility of Marmosets to Yellow Fever Virus. **J. Exp. Med.**, United States, v. 52, n. 3, p. 405–416, 1 set. 1930c. doi: 10.1084/jem.52.3.405. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2131878/pdf/405.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2022.

DAVIS, N. C.; SHANNON, R. C. Studies on Yellow Fever in South America: V. Transmission experiments with certain species of *Culex* and *Aedes*. **J. Exp. Med.**, United States, v. 50, n. 6, p. 803–808, 1929. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2131669/pdf/803.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2022.

DAVIS, N. C.; SHANNON, R. C. The location of Yellow Fever Virus in infected mosquitoes and the possibility of hereditary transmission. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 335–344, 1930. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113836.

DÉGALLIER, N. *et al.* A ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectiva. **Rev. Fund. Serv. Saúde Pública (SESP)**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 127–130, 1986.

DÉGALLIER, N. *et al.* New entomological and virological data on the vectors of sylvatic Yellow Fever in Brazil. **Ciênc. Cult.** São Paulo, v. 44, n. 2/3, p. 136–142, 1992.

DELATORRE, E. *et al.* Distinct YFV Lineages co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian regions from 2015 to 2018. **Front. Microbiol.**, Switzerland, v. 10, s.n. p. 1–12, 2019. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6543907/pdf/fmicb-10-01079.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2022.

ESPÍRITO SANTO. **Mapas. Sistema Integrado de Bases Geoespaciais do Estado do Espírito Santo (GEOBASES)**. Disponível em: <<https://geobases.es.gov.br/links-para-mapas>>. Acesso em: 26 dez. 2016.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, New York, v. 26, n.4, p. 531-535, 1966.

FERNANDES, N. C. C. A. *et al.* Outbreak of Yellow Fever among nonhuman primates, Espírito Santo, Brazil, 2017. **Emerg. Infect. Dis.**, United States, v. 23, n. 12, p. 2038–2041, 2017. doi: 10.3201/eid2312.170685 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708241/pdf/17-0685.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2023.

FERREIRA, K. V. *et al.* Histórico da Febre Amarela no Brasil e a importância da vacinação antiamarílica. **Arq. Bras. Ciênc. Saúde**, Santo André, v. 36, n. 1, p. 40–47, 2011. Disponível em: <https://www.portalnepas.org.br/abcs/article/view/74/72>; Acesso em: 03 jan. 2023.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. vol.2. São Paulo: Fac. Saúde Pública. Univ. São Paulo, 1965. 506p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica. Identificação, Biologia, Epidemiologia**. Vol. 2. São Paulo: Fac. Saúde Pública. Univ. São Paulo, 2002. 864p.

FRANCO, O. **História da Febre Amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Departamento Nacional de Endemias Rurais, 1969. 212p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0110historia_febre.pdf. Acesso em: 02 fev. 2023.

FRIERSON, J. G. The Yellow Fever vaccine: a history. **Yale J. Biol. Med.**, United States, v. 83, n. 2, p. 77–85, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892770/pdf/yjbm_83_2_77.pdf. Acesso em: 15 dez. 2022.

FUNASA. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde, Brasília-DF, 1999. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_feam.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2023.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow Fever: a reemerging threat. **Clin. Lab. Med.** United States, v. 30, n. 1, p. 237–260, 2010. doi: 10.1016/j.cll.2010.01.001. Disponível em: [cbl.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349381/pdf/nihms-591528.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349381/pdf/nihms-591528.pdf). Acesso em: 06 jan. 2023.

GERMAIN, M. *et al.* Yellow Fever in the Gambia, 1978–1979: Entomological aspects and epidemiological correlations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** United States, v. 29, n.5, p. 929–940, 1980. doi: 10.4269/ajtmh.1980.29.929.

GOLDANI, L. Z. Yellow Fever outbreak in Brazil, 2017. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 21, n. 2, p. 123–124, 2017. Disponível em: <https://www.bjid.org.br/en-pdf-S1413867017301976>. Acesso em: 10 dez. 2022.

GONTIJO, N. R. C. **Impacto do surto de Febre Amarela na ocorrência de primatas em paisagens fragmentadas do Espírito Santo**. 2019. 61f. Dissertação [Mestrado] Programa de PósGraduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal). Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo. 2019.

GOOGLE LLC. **Google Earth Pro**. 2022. Disponível em: <https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/>. Acesso em: 24 fev. 2023.

HAMLET, A. *et al.* Seasonality of agricultural exposure as an important predictor of seasonal yellow fever spillover in Brazil. **Nature Communications**, s. l. v. 12, n. 1, p. 1-11, 2021. doi.org/10.1038/s41467-021-23926-y. Disponível em: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/s41467-021-23926-y%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/s41467-021-23926-y%20(1).pdf). Acesso em: 05 dez. 2022.

HANLEY, K. A. *et al.* Fever versus Fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of Dengue Virus and Yellow Fever Virus. **Infect. Genet. Evol.**, Netherlands, v. 19, p. 292–311, 2013. doi. 10.1016/j.meegid.2013.03.008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749261/pdf/nihms459633.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2022.

HARDY, J. L. *et al.* Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Ann. Rev. Entomol.** United States, v. 28, n. 1, p. 229–262, 1983.

HERVÉ, J. P. *et al.* Isolation of Yellow Fever Virus from *Haemagogus (Hag.) albomaculatus* Theobald in Brazil. **Arthropod-borne Virus Information Exchange**, v. 5, p. 53, 1984. Disponível em: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers15-10/010050675.pdf. Acesso em: 03 dez. 2022.

HERVÉ, J. P. *et al.* Ecologia da Febre Amarela silvestre no Brasil. **Rev. Fund. SESP**. Instituto Evandro Chagas. Rio de Janeiro, v.31, n.2, p. 131–138, 1986. Disponível em: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_45-46/010007267.pdf. Acesso em: 20 nov. 2022.

HERVÉ, J. P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A. Ecologia da febre amarela no Brasil. **Rev. Fund. SESP**. Instituto Evandro Chagas. Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 11–19, 1983. Disponível em: <https://patuaback.iec.gov.br/server/api/core/bitstreams/7548d860-e29e-4a31-9f06-69a42923aa6a/content>. Acesso em: 10 dez. 2022.

HIGGS, S. How do mosquito vectors live with their viruses? Em: **Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases**. [s.l.] Cambridge University Press, 2004. p. 103–138. doi:10.1017/cbo9780511754845.008.

IBMP – Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Kit Febre Amarela IBMP. 2020. Disponível em: https://www.ibmp.org.br/pt-br/wp-content/uploads/2020/08/IU-IVD-Kit-Febre-Amarela_IBMP.pdf. Acesso em: 20 fev 2023.

INCAPER. **Programa de Assistência Técnica e Extensão Rural, PROATER 2020-2023**. Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural. Governo do Estado do Espírito Santo, 2020. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/proater>>. Acesso em: 27 out. 2022.

JOHANSSON, M. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; STAPLES, J. E. The whole iceberg: Estimating the incidence of Yellow Fever Virus infection from the number of severe cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. England, v.108, n. 8, p.482-7, 2014. doi: 10.1093/trstmh/tru092. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632853/pdf/nihms726354.pdf>; Acesso em 10 jan 2023.

JOHNSON, B. W. *et al.* Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian Yellow Fever Virus isolate. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. England, v. 96, n. 6, p. 611–613, 2002. Doi:10.1016/s0035-9203(02)90326-3.

KRAMER, L. D.; EBEL, G. D. Dynamics of Flavivirus infection in mosquitoes. **Adv Virus Res**. United States, v. 60, s.n., p. 187–232, 2003. doi: 10.1016/s0065-3527(03)60006-0.

KUMM, H. W.; CERQUEIRA, N. L. The rôle of *Aedes leucocelaenus* in the epidemiology of jungle Yellow Fever in Brazil. **Bul. Entomol. Res.**, London, v. 42, n. 1, p. 195–199, 1951. doi:10.1017/s0007485300025281.

LAEMMERT, H. W.; HUGHES, T. P.; CAUSEY, O. R. The invasion of small forests by yellow fever virus as indicated by immunity in *Cebus* monkeys. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. United States, v. 29, n. 4, p. 555-65, 1949. doi: 10.4269/ajtmh. 1949. s1-29.555.

LAEMMERT, H. W.; FERREIRA, L. D. C.; TAYLOR, R. M. Part II—Investigations of vertebrate hosts and arthropod vectors. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. United States, v. s1-26, n. 6_Suppl_2, p. 23–69, 1946. doi:<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1946.s1-26.23>.

LAEMMERT, H. W. KUMM, H. W. The Susceptibility of Howler Monkeys to Yellow Fever Virus 1. **Am J Trop Med Hyg**. United States, v. 30, n. 5, p. 723–731, 1950. doi: 10.4269/ajtmh. 1950. s1-30.723.

LANE, J. **Neotropical Culicidae**. v. 2, São Paulo: Ed. USP, 1953. 565p.

LINDSEY, N. P. *et al.* Yellow Fever resurgence: An avoidable crisis? **npj Vaccines**, United Staes, v. 7, n. 1, p.137, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00552-3>.

LUTZ, A. Reminiscencias da Febre Amarela no estado de São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 127–142, 1930. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/47944/Adolpho_Lutz_v24n3_IOC_1930.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em 10 fev 2023.

MARCONDES, C.; ALENCAR, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. **Rev. Bioméd.** Yucatan, v. 21, n. 3, p. 221–238, 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-RevisaoDeMosquitosHaemagogusWillistonDipteraCulici-3713308.pdf>. Acesso em: 15 dez 2022.

MARES-GUIA, M. A. M. D. M. *et al.* Yellow Fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2020. Disponível em: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/s13071-020-3966-x.pdf>. Acesso em: 10 dez 2022.

MASCHERETTI, M. *et al.* Yellow Fever: Reemerging in the State of Sao Paulo, Brazil, 2009. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 881–889, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/d9s64XNtdktGtxKDNNg6yVr/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 05 jan 2023.

MONATH, T. P. Yellow Fever: An update. **Lancet, Infect. Dis.**, New York, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001. doi: 10.1016/s1473-3099(01)00016-0.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever. **J. Clin. Virol.** Netherlands, v. 64, s.n. p. 160–173, 2015. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.030.

MORENO, E. S. *et al.* Reemergence of Yellow Fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 290–296, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/smL957rdW5jnhcpZVpBGzmf/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 20 jan 2023.

MORENO, E. S. *et al.* Epizootias de Febre Amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo (Online)**, v. 55, n. 1, p. 45–50, jan. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/DDnrvBbdRS6fr6549QsrmGK/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 10 jan 2023.

MOUSSALLEM, T. M. *et al.* Yellow Fever outbreak in a rural-urban mixed community of Espírito Santo, Brazil: epidemiological aspects. **Rev. Panam. Salud. Publica**, Washington, v. 43, n. e29, p. 1-7, 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50478/v43e292019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 nov 2022.

MS. Ministério da Saúde. **Em 2020, Ministério da Saúde amplia público para vacinas contra Febre Amarela e gripe. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde.**, 2020. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contrafebre-amarela-e-gripe/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MUTEBI, J.-P.; BARRETT, A. D. T. The epidemiology of Yellow Fever in Africa. **Microbes Infect.** France, v. 4, n. 14, p. 1459–1468, 2002. doi: 10.1016/s1286-4579(02)00028-x.

NEVES, M. S. A. S. **Espécies de mosquitos do gênero Sabethes Robineau Desvoidy, 1827 (INSECTA: DIPTERA: CULICIDAE) do Brasil: Levantamento taxonômico e chaves de identificação dicotômica e interativa ilustradas.** 2019. 130 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância e Controle de Vetores) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

NOTT, J. C. **The cause of Yellow Fever.** Nova York: Cornell University, 1848. v. 4. p. 1-81. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ShZDAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA4&dq=NOTT,+J.+C.+The+cause+of+Yellow+Fever&ots=Sni-QZMXKM&sig=ds259NmZxaGXk1RLgckiMc8vIBA#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 10 dez 2022.

NUNES, M. R. T. *et al.* Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian Yellow Fever Virus strains. **J. Virol.** United States, v. 86, n. 24, p. 13263–13271, 15 dez. 2012. doi: 10.1128/JVI.00565-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3503022/pdf/zjv13263.pdf>. Acesso em: 10 dez 2022.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Diagnóstico laboratorial de infecção pelo Vírus da Febre Amarela.** Organização Mundial da Saúde. 2018, p. 1-18. Disponível em: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=guias-7134&alias=46876-diagnostico-laboratorial-de-infeccao-pelo-virus-da-febre-amarela&Itemid=270&lang=pt#:~:text=O%20diagn%C3%B3stico%20da%20febre%20amarela,o%20contexto%20%C3%B3gico%20e%20cl%C3%ADnico.>. Acesso em: 9 jan. 2023.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological alert Yellow Fever.** 31 August 2022. Washington, D.C., p. 1-7, 2022. Disponível em: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/2022august-phe-epidemiological-alertyellowfeveren%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/2022august-phe-epidemiological-alertyellowfeveren%20(1).pdf) . Acesso em: 17 jan. 2023.

PATTERSON, K. D. Yellow Fever epidemics and mortality in the United States, 1693–1905. **Soc Sci Med**, England, v. 34, n. 8, p. 855–865, abr. 1992. doi: 10.1016/0277-9536(92)90255-o.

PEREIRA DOS SANTOS, T. *et al.* Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. **Emerg. Microbes. Infect.** United States, v. 7, n. 1, p.1-8, 2018. doi: 10.1038/s41426-018-0194-y. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6258732/pdf/41426_2018_Article_194.pdf. Acesso em 25 nov 2022.

POSSAS, C. *et al.* Yellow Fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 10, p. 1-12, 2018. doi: 10.1590/0074-02760180278. Disponível em: doi: 10.1590/0074-02760180278. Acesso em: 12 jan 2023.

QGIS TEAM. **Software QGIS 3.12.2.** Disponível em: <https://www.qgis.org/pt_BR/site/>. Acesso em: 24 maio. 2020.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical.** Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 24 maio. 2020.

REED, W.; CARROLL, M. D. J.; AGRAMONTE, M. D. A. The etiology of Yellow Fever: a preliminary note. **Public. Health Pap. Rep.** United States, v. 26, n. 7, p. 37-53, 16 fev. 1900. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2329228/pdf/pubhealthpap00031-0042.pdf>. Acesso em: 20 dez 2022.

REZENDE, I. M. DE *et al.* Persistence of Yellow Fever Virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. **PLoS Negl. Trop. Dis.** United States, v. 12, n. 6, p. 1-12, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006538. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6002110/pdf/pntd.0006538.pdf>. Acesso em: 30 nov 2022.

ROMANO, A. P. M. *et al.* Yellow Fever Outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. **PLoS Negl Trop Dis**, United States, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002740. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/13561/5/Artigo%20-%20Alessandro%20Pecego%20Martins%20Romano%20-%202014.pdf>. Acesso em: 05 dez 2022.

SALLUM, M. A. M. *et al.* Identification keys to the Anopheles mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). IV. Adult females. **Parasites and Vectors**, United States, v. 13, n. 1, p.1-25, 2020. Disponível em: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/s13071-020-04299-5.pdf>. Acesso em: 10 jan 2023.

SEGURA, M. N. O.; CASTRO, F. C. **Atlas de Culicídeos na Amazônia brasileira: características específicas de insetos hematófagos da família Culicidae.** Belém: Instituto Evandro Chagas. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007. 67p.

SERVICE, M. W. **Mosquito Ecology: Field Sampling Methods.** 2. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. 988p. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-1868-2>.

SHANNON, R.; WHITMAN, L.; FRANCA, M. Yellow Fever Virus in jungle mosquitoes. **Science**, United States, v. 88, n. 2274, p. 110–111, 1938. doi: 10.1126/science.88.2274.110.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **The Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379–423, 1948. Disponível em: <https://people.math.harvard.edu/~ctm/home/text/others/shannon/entropy/entropy.pdf>. Acesso em: 10 jan 2023.

SIQUEIRA, P. C. *et al.* Completude das fichas de notificação de Febre Amarela no estado do Espírito Santo, 2017. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v.29, n.3, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ress/a/N55R9XwwZMgZ5Vc3RfGzG6b/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 05 dez 2022.

SIQUEIRA, P. C. *et al.* Difusão espaço-temporal da Febre Amarela silvestre em um estado do Sudeste do Brasil, 2017. **Cad. Saúde Pública** (Online), v. 37, n.9, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/mTLVnkkMHFdJtDTYJQHbMWJ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 30 dez 2022.

SOPER, F. L. *et al.* Yellow Fever without *Aedes aegypti*. Study of a rural epidemic in the Valle do Chanaan, Espirito Santo, Brazil, 1932. **Am. J. Epidemiol.** Baltimore, v. 18, n.3, p. 555–587, 1933.

SOPER, F. L. Yellow Fever: The present situation (October 1938) with special reference to South America. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (Online)**, v. 32, n. 3, p. 297–322, 1938. doi: [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(38\)90045-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(38)90045-8).

SOPER, F. L. The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. **Am. J. Public Health Nations Health**, United States, v. 53, n.1, p. 7–16, 1963. doi: 10.2105/ajph.53.1.7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1253857/pdf/amjphnation00181-0009.pdf>. Acesso em: 15 dez 2022.

STOKES, A.; BAUER, J.; HUDSON, N. Experimental transmission of Yellow Fever to laboratory animals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v. s1-8, n. 2, p. 103–164, 1928.

STRODE, G. K. **Yellow Fever**. New York-London: McGraw-Hill, 1951. 710p.

VAINIO, J.; CUTTS, F. **Yellow Fever**. **World Health Organization**. Geneva, 1998. 87p. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/64455>>. Acesso em: 10 jan. 2023.

VAN DER STUYFT, P. *et al.* Urbanisation of Yellow Fever in Santa Cruz, Bolivia. **Lancet**, England, v. 353, n. 9164, p. 1558–1562, 1999. doi: 10.1016/s0140-6736(99)03291-2.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* An epidemic of sylvatic Yellow Fever in the southeast region of Maranhao State, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and entomologic findings. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v. 57, n. 2, p. 132–137, 1997. doi: 10.4269/ajtmh.1997.57.132.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Epidemic of jungle Yellow Fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. **J. Med. Virol.** New York, v. 65, n. 3, p. 598–604, 2001a. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.2078>.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Yellow Fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998–1999: Entomologic and epidemiologic findings. **Emerg. Infect. Dis.** United States, v. 7, Suppl. 3, p. 565–569, 2001b. doi: 10.3201/eid0707.010738.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Isolations of Yellow Fever Virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** England, v. 97, n. 1, p. 60–62, 2003. doi: 10.1016/s0035-9203(03)90023-x.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Brasília, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/3dpcS3SXsMPVt6LrTZVgJtj/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 dez 2022.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Rev. Saúde Pública** (Online), v. 44, n. 6, p. 1144–1149, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/p4BR8p9BmNvxDtkBhskNxFc/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 20 dez 2022.

VIEIRA, G. *et al.* High speed video documentation of the mosquito *Sabethes albiprivus* egg-catapulting oviposition behavior (Diptera: Culicidae). **Neotrop. Entomol.** Netherlands, v. 49, n. 5, p. 662–667, 2020. doi: 10.1007/s13744-020-00782-x.

VIRGENS, T. M. DAS *et al.* Fauna of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Goytacazes National Forest and surrounding area, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Biota Neotropica* (Online. Edição em inglês), v. 18, n. 1, p. 1–6, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/LhxmGFny6HXkdNtLNss9VxK/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 05 fev 2023.

VIRALZONE, S. I. B. **Flavivirus. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)**, 2023. Disponível em: <<https://viralzone.expasy.org/24>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

WHITE, C. Yellow Fever; history of the disease in the eighteenth and nineteenth century. **J. Kans. Med. Soc.** Topeka, v. 60, n. 8, p. 298–302, 2018.

WHITMAN, L.; ANTUNES, P. C. A. Studies on the capacity of various Brazilian mosquitoes, representing the Genera *Psorophora*, *Aedes*, *Mansonia*, and *Culex*, to transmit Yellow Fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore, v. 17, n. 6, p. 803–823, 1937. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1937.s1-17.803>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow fever. World Health Organization**, 7 maio 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. New York: Springer, 2009. 212p.

WILKERSON, R. C.; LINTON, Y-M.; STRICKMAN, D. **Mosquitoes of the world**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2021. 2v. 1332p.

ANEXO A – Licença para coleta de material zoológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 32449-1	Data da Emissão: 26/01/2012 18:17
Dados do titular	
Nome: ALOÍSIO FALQUETO	CPF: 421.231.607-25
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Culicidae, Psychodidae, Reduviidae, Simuliidae, Ceratopogonidae
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO	

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59693833



Página 1/2

