

## Febre amarela silvestre no estado de São Paulo, Brasil: casos humanos autóctones

### Jungle yellow fever in São Paulo state, Brazil: human autochthonous cases

Iray M. ROCCO<sup>1\*</sup>  
Gizelda KATZ<sup>2</sup>  
Rosa M. TUBAKI<sup>3</sup>.

RIALA6/959

Rocco, I. M.; Katz, G. e Tubaki, R. M - Febre amarela silvestre no estado de São Paulo, Brasil: casos humanos autóctones. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 201 - 206, 2003.

**RESUMO.** Os autores relatam a ocorrência e os dados resultantes das investigações de casos humanos de Febre Amarela (FA) silvestre no estado de São Paulo. Em 2000, 7 casos suspeitos de FA silvestre foram confirmados, 5 importados de outros Estados e 2 provavelmente autóctones, de áreas localizadas às margens do Rio Grande, à noroeste do estado de São Paulo. Quatro deles evoluíram para óbito. Inquérito sorológico foi realizado em 630 habitantes de 13 municípios ribeirinhos e pesquisa entomológica foi feita nas áreas suspeitas de transmissão autóctone. A confirmação desses casos foi feita por testes sorológicos clássicos, isolamento de vírus e técnicas moleculares. As 7 amostras de soros resultaram positivas em pelo menos uma das técnicas empregadas. Todas as amostras foram reagentes no teste de MAC-ELISA. Obteve-se isolamento de vírus a partir de amostras de soros de 4 pacientes e nenhum isolamento de mosquitos. O inquérito sorológico com 630 soros, mostrou 5,23% de prevalência de anticorpos para o vírus FA. A detecção de 2 casos autóctones no estado de São Paulo confirma a tendência de deslocamento da transmissão da Febre Amarela para o Sul do Brasil. A presença de anticorpos para FA em população de áreas sem transmissão recente, revela risco de reurbanização da doença.

**PALAVRAS-CHAVE.** flavivirus, Febre Amarela silvestre; casos humanos; investigação eco-epidemiológica

<sup>1</sup> e demais autores: Akemi SUZUKI; Terezinha Lisieux M. COIMBRA; Ivani B. FERREIRA; Adélia H. N. KAWAMOTO; Esther L. B. CHAMELET; Cecília L. S. SANTOS; Luiz E. PEREIRA; Antonia . MARTI; Sandra R. MAYER; Dulce M. SOUZA; Danya M. FIALHO; Raimundo N. SANTOS; Renato P. SOUZA e Luiza T. M. de SOUZA, Serviço de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

<sup>2</sup> e demais autores: Ciléia H. TENGAN e Márcia R. BUZZAR, Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, São Paulo e Márcia C. F. PRADO REINA, Vigilância Epidemiológica de São José do Rio Preto.

<sup>3</sup> Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN, São Paulo e Rubens CARDOSO JR, SUCEN de São José do Rio Preto.

\*Endereço para correspondência: Iray Maria Rocco, Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Virologia, Av. Dr. Arnaldo 355, São Paulo, CEP: 01246-902, Tel: (11) 3068-2902, e-mail: imrocco@uol.com.br

## INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (FA) é uma doença aguda causada pelo arbovírus de mesmo nome que é protótipo do Gênero *Flavivirus*, Família *Flaviviridae*. A doença é conhecida desde o século XVII e até hoje causa epidemias na África e Américas, com alta taxa de morbidade e de letalidade na população humana. Existem dois padrões epidemiológicos de transmissão da doença: urbano e silvestre. Sob o ponto de vista clínico, etiológico, imunológico e histopatológico ambas as formas são idênticas. Nas Américas, o ciclo de manutenção da FA silvestre envolve mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* como vetores-reservatórios, primatas não humanos dos gêneros *Alouatta*, *Cebus*, *Ateles* e *Callithrix*, como hospedeiros naturais e o homem é hospedeiro acidental<sup>13</sup>. A FA urbana tem como vetor o mosquito *Aedes aegypti* e o homem é o principal hospedeiro. A incidência da FA é maior nos meses de chuvas e de temperaturas mais elevadas, quando as condições ambientais favorecem maior proliferação e atividade dos vetores<sup>13</sup>.

Os países da América do Sul que relatam casos de FA periodicamente são: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru<sup>7</sup>. O Brasil tem uma extensa área ocidental onde a FA silvestre é enzoótica (Acre, Amazonas, Amapá, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Maranhão e Pará) e uma área costeira, indene, nos estados das regiões Nordeste, Sudeste e Sul<sup>7</sup>. No limite entre essas duas áreas, está localizada a área de transição ou epizootica que abrange parte dos estados de Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul<sup>7</sup>. A forma urbana da doença não é registrada no país desde 1942. A FA silvestre ocorre anualmente, como casos esporádicos ou surtos, em florestas ou em zonas rurais da Amazonia, região Centro-Oeste, Maranhão e Minas Gerais<sup>4,15,17,18,19</sup>. Desde 1998 tem-se observado uma tendência de expansão nas áreas de transição da FA silvestre, com aumento gradual da notificação de casos e epizotias como verificado em Minas Gerais em 2001<sup>4</sup> e no Rio Grande do Sul em 2000<sup>8</sup>, respectivamente.

Em 2000, foram notificados 7 casos no estado de São Paulo, sendo 5 importados de outras regiões do país e 2 provavelmente autóctones. Estes últimos ocorreram no extremo noroeste do estado, em municípios próximos, localizados às margens do Rio Grande (Santa Albertina e Ouroeste). Não havia, no estado, registro de transmissão recente de FA. Os últimos casos autóctones de FA silvestre datavam de 1953 sendo, desde então, detectados apenas alguns casos esporádicos, importados de regiões enzoóticas<sup>3,14</sup>.

A partir da confirmação laboratorial dos prováveis casos autóctones, técnicos da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, realizaram uma investigação eco-epidemiológica naquela região. A população ribeirinha de áreas adjacentes aos locais prováveis de infecção recebeu a vacina anti-amarilica, como medida de prevenção.

Os autores relatam a ocorrência de casos humanos de FA silvestre, detectados no estado de São Paulo, importados e/

ou autóctones, e os dados resultantes das investigações.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Investigação epidemiológica

Técnicos da Vigilância Epidemiológica investigaram o local provável de infecção dos dois casos suspeitos de autoctonia; verificou-se que, nos dois casos, havia relatos de pescaria às margens do Rio Grande. Com base no diagnóstico epidemiológico, foi elaborado um estudo em 13 municípios localizados às margens do Rio Grande (Cardoso, Icem, Indiaporã, Mesópolis, Mira Estrela, Orindiuva, Ouroeste, Paulo de Faria, Populina, Santa Albertina, Santa Clara D'Oeste, Santa Rita D'Oeste e Rubinéia), constituído de entrevistas e coleta de amostras de sangue, precedendo a vacinação anti-amarilica.

### Investigação entomológica e primatológica

Após a confirmação do primeiro caso, foram realizadas 3 viagens de campo com o objetivo de coletar mosquitos para verificar a possível circulação do vírus amarílico na área. As capturas de mosquitos foram realizadas no município de Santa Albertina, às margens do Rio Grande, em ambiente de mata residual, durante as horas mais luminosas do dia, das 10 às 15 horas, por técnicos previamente imunizados contra Febre Amarela. Realizou-se captura com puçá e aspirador bucal em plataforma construída na copa de uma árvore, a aproximadamente 5 metros de altura. Coletou-se mosquitos em grande extensão do interior da mata; com capturas de 5 minutos, em intervalos de aproximadamente 5 metros entre um ponto e outro. Em alguns pontos determinados no interior e na margem da mata empregou-se armadilhas tipo CDC-miniatura, iscadas com gelo seco.

Os mosquitos capturados foram anestesiados com gás carbônico proveniente do gelo seco, congelados em nitrogênio líquido e levados para o laboratório, onde foram conservados em congeladores a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A identificação dos mosquitos foi realizada em superfície congelada, até o nível de espécie ou de gênero. Foram constituídos lotes de exemplares de mesma espécie e processados para isolamento de vírus. Com relação a primatas, moradores da região relataram que havia macacos residentes na mata, os quais costumemente aproximavam-se da sede da fazenda à procura de alimentos. Entretanto, relataram também que, pela frequência desses animais nos arredores da sede, aparentemente a população havia sofrido uma redução, embora não tivessem observado exemplares mortos ou doentes na mata. Não foi possível realizar capturas de macacos para obtenção de amostras de sangue para análise laboratorial.

### Investigação laboratorial:

Amostras de sangue e/ou soro de todos os pacientes com clínica compatível com FA, fragmentos de vísceras de dois pacientes que foram a óbito e mosquitos coletados no campo, foram armazenados e transportados em balão de nitrogênio até o laboratório. Para o inquérito soropidemiológico foram feitas entrevistas e obtidos o consentimento livre e esclarecido para

as análises de 630 amostras de sangue de ribeirinhos, supostamente não imunizados contra a FA, procedentes de 13 municípios previamente selecionados.

#### **Isolamento de vírus em camundongos**

Para o isolamento de vírus em camundongo foram utilizadas amostras de sangue e/ou soro, fragmentos de vísceras e mosquitos. As amostras de sangue e soro foram inoculadas puras e diluídas (1:2 em solução fosfatada tamponada, pH 7.2, com albumina bovina - SIGMA, St. Louis, MO, USA) 0,75% e antibióticos: 100 IU de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). Fragmentos de vísceras, de aproximadamente 1 cm, foram triturados com pó de vidro em 1,8 ml do mesmo diluente descrito anteriormente e centrifugados a 800 x g por 10 minutos, em centrífuga refrigerada. Lotes de mosquitos, separados por espécie, foram triturados em tampão fosfato com 1,8% de albumina bovina, estreptomicina-penicilina, nos seguintes volumes: de 1 a 10 mosquitos, usou-se 1 ml de diluente; de 11 a 20, 1,5 ml; de 21 a 30, 2 ml; de 31 a 40, 2,5 ml e acima de 41, 3,0 ml. A seguir as suspensões foram centrifugadas a 11.000 x g por 30 minutos, em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram inoculados, via intracerebral, em lotes de seis camundongos *Swiss* lactentes, em doses de 20µl. Os animais foram observados diariamente, por período de 21 dias. Realizou-se passagens seriadas de cérebros de camundongos que apresentaram sinais de doença até se obter o isolamento do vírus. As cepas isoladas foram identificadas por meio de testes de Fixação de Complemento (FC), segundo Fulton e Dumbell<sup>6</sup> e Neutralização (N), segundo Shope e Sather<sup>16</sup>.

#### **Isolamento de vírus em Cultura de Células**

Alíquotas de 20µl de soros de fase aguda e de suspensões, preparadas a partir de vísceras e de lotes de mosquitos (as mesmas utilizadas para inoculação em camundongos), foram inoculados em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36. Essa linhagem foi cultivada, 24 horas antes a 28°C, em tubos de ensaio com 1 ml de meio Leibovitz (L-15, GIBCO), suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de triptose fosfato e 10% de soro bovino fetal e antibióticos. No dia da inoculação foi acrescentado em cada tubo 1 ml do meio Leibovitz sem soro bovino fetal. Os tubos foram imediatamente incubados a 28°C. Após 10 dias foram centrifugados e os sobrenadantes separados e guardados em tubos de hemólise a - 70°C. As células nos tubos foram ressuscitadas em 0,5 ml de PBS, pH 7.5, depositadas em lâminas próprias, contendo 16 orifícios paralelos e após secagem a temperatura ambiente foram fixadas às lâminas em acetona P.A. a -20°C por 10 minutos. As lâminas foram então submetidas a testes de Imunofluorescência Indireta, utilizando-se fluido ascítico de camundongo imune para flavivírus, incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e lavadas em PBS por 10 minutos. Em seguida foi adicionada anti-gamaglobulina total de camundongo, desenvolvida em cabra, marcada com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA), as lâminas

foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas com PBS. As lâminas foram fixadas às lâminas com uma gota de glicerina tamponada e a leitura foi realizada em microscópio fluorescente. Os positivos foram tipados em outro teste de imunofluorescência, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, utilizando anticorpo monoclonal para o vírus FA, fornecido pelo CDC de Atlanta, GA, USA.

#### **Diagnóstico Molecular**

Sobrenadantes de cultura de células C6/36 foram utilizados para análise molecular do genoma viral pela técnica de RT-PCR. O RNA foi extraído pela técnica de Chomczynski e Sacchi<sup>1</sup>, processando-se a amplificação após transcrição reversa, utilizando-se iniciadores específicos para a região que codifica a proteína do envelope viral nas posições 625-1312 nucleotídeos<sup>11</sup>. Os produtos amplificados foram detectados por análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

#### **Imunodiagnóstico**

As sete amostras de soros dos pacientes, juntamente com aquelas coletadas de familiares e de comunicantes, foram submetidas ao teste imunoenzimático ELISA para captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA)<sup>12</sup>, utilizando-se antígeno do vírus FA (BeH111). As 630 amostras coletadas para o inquérito soropidemiológico foram submetidas ao teste de Inibição da Hemaglutinação (IH), segundo Clarke e Casals<sup>2</sup>, para pesquisa de anticorpos totais, com antígenos de vírus dos seguintes gêneros: *Flavivirus*: Dengue 1 (Hawaii); Dengue 2 (Tr1751); Encefalite St. Louis (SPAn11916); Iguape (SPAn71686); Ilheus (BeH7445); Rocío (SPH34675); YF (BeH111); *Alphavirus*: Encefalite Equina do Leste (SPAn14723); Mucambo (SPAn15600) e *Bunyavirus*: Caraparu (SPAn26550).

## **RESULTADOS**

As amostras biológicas dos 7 casos humanos resultaram positivas para FA, em pelo menos uma das técnicas empregadas (Tabela 1). Obteve-se isolamento de vírus em quatro casos, sem que nenhum efeito citopático fosse observado nas culturas de células. As amostras de soros dos 7 casos foram reagentes no teste de MAC-ELISA, sendo consideradas positivas aquelas que apresentaram densidade óptica superior ao valor de limite de reatividade (>0.200). As amostras coletadas de familiares e comunicantes foram negativas.

As cepas isoladas também apresentaram resultados positivos por PCR, com amplificação de fragmentos de 687 pares de bases. Dentre os 7 casos confirmados, 4 (57,1%) evoluíram para óbito, 100% pertenciam ao sexo masculino, na faixa etária de 20 a 49 anos, 71,4 % dos casos adquiriram a doença em atividade de lazer e 28,6 % em atividade ocupacional. Em relação aos sintomas clínicos, 71,4% apresentaram icterícia, 42,9% insuficiência renal e 28,6% manifestações hemorrágicas.

**Tabela 1.** Investigação epidemiológica e laboratorial dos 7 casos de Febre Amarela notificados no estado de São Paulo, Brasil.

Paciente	Idade	Sexo	Ocupação	Evolução	Amostra	Isolamento de vírus células	MAC- camundongo	PCR ELISA	FC	N
SPH 188002	36	M	Médico	Cura	Soro/sangue	+	+	+	+	+
SPH 188057	22	M	Comerciante	Cura	Soro/sangue	+	+	+	+	+
SPH 188483	25	M	Estudante	Cura	Soro	Nr	Nr	+	Nr	Nr
SPH 189057	44	M	Comerciante	Óbito	Sangue do coração Vísceras	-	-	+	-	Nr
SPH 189265	38	M	Lavrador	Óbito	Soro	-	-	+	Nr	Nr
SPH 189642	39	M	Lavrador	Óbito	Soro	+	+	+	+	Nr
SPH 190388	37	M	Caminhoneiro	Óbito	Soro	+	+	+	+	Nr

SPH - amostra de origem humana (H), isolada no Estado de São Paulo (SP)

Nr - não realizado, + positivo, - negativo

Dentre as 630 amostras processadas pela técnica de IH, foram consideradas positivas aquelas que apresentam títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação maiores que 1/20. Destas 33 (5,23%) foram reagentes, sendo que 27 amostras tiveram resposta heterotípica para flavivírus, enquanto 6 apresentaram anticorpos monotípicos para FA; 3 de Ouroeste e as outras 3, de Mesópolis, Indiaporã, e Rubinéia.

Foram coletados e submetidos à prova de isolamento de vírus 1.110 mosquitos, divididos em 334 lotes. Os mosquitos pertenciam a 10 gêneros distintos: *Haemagogus*, *Sabethes*, *Limatus*, *Aedes*, *Psorophora*, *Runchomyia*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Coquillettidia*. As espécies mais abundantes nas coletas foram *Aedes scapularis*, *Haemagogus capricornii* e *Sabethes chloropterus* (Tabela 2).

Embora muitos espécimes do gênero *Haemagogus* (supostos vetores) tenham sido testados, nenhum isolamento de vírus foi obtido a partir dos mosquitos coletados em Santa Albertina, nos meses de março, abril e maio, 2000, período que sucedeu a detecção dos casos da região.

## DISCUSSÃO

No período estudado, além dos 7 casos, foram notificados 55 indivíduos com suspeita de infecção por FA no Estado de São Paulo, sem que nenhum deles fosse confirmado. Com relação aos resultados dos testes de IH realizados com os 630 soros, não foi possível, com base nas informações obtidas na investigação epidemiológica, esclarecer a natureza da resposta imune verificada em cada caso. Vários inqueridos não souberam informar com clareza, sobre vacinação anti-amarílica passada e outros relataram deslocamentos para outros Municípios do Estado e de outras Unidades da Federação. Os poucos indivíduos que afirmaram não terem recebido vacina tinham histórico de deslocamento para outras regiões.

**Tabela 2.** Mosquitos coletados no município de Santa Albertina-SP, nos meses de março, abril e maio de 2000.

Gênero	Espécie	Número	%
<i>Aedes</i>	<i>Ae albopictus</i>	8	0,72
	<i>Ae argyrothorax</i>	2	0,18
	<i>Ae scapularis</i>	763	68,74
	<i>Ae serratus</i>	2	0,18
	<i>Ae sp</i>	4	0,36
<i>Anopheles</i>	<i>An (Nys) galvaoi</i>	1	0,09
	<i>An (Nys) sp</i>	14	1,26
	<i>An (Nys) strodei</i>	2	0,18
	<i>An (Nys) triannulatus</i>	5	0,45
<i>Coquillettidia</i>	<i>Cq venezuelensis</i>	1	0,09
<i>Culex</i>	<i>Cx (Cux) sp</i>	36	3,24
	<i>Cx (Mel) sp</i>	7	0,63
	<i>Cx scimitator affinis</i>	2	0,18
<i>Haemagogus</i>	<i>Hg capricornii</i>	164	14,77
	<i>Hg leucocelaenus</i>	1	0,09
<i>Limatus</i>	<i>Li durhami</i>	6	0,54
<i>Mansonia</i>	<i>Ma (Man) sp</i>	3	0,27
<i>Psorophora</i>	<i>Ps (Jant) sp</i>	4	0,36
	<i>Ps albigena</i>	14	1,26
	<i>Ps ferox</i>	10	0,9
<i>Runchomyia</i>	<i>Runchomyia sp</i>	1	0,09
<i>Sabethes</i>	<i>Sa (Sab) sp</i>	1	0,09
	<i>Sa belisarioi</i>	4	0,36
	<i>Sa chloropterus</i>	55	4,95
Total		1110	99,98

Apesar dos esforços de captura de mosquitos, para detectar a circulação do vírus na área estudada, não se obteve sucesso nas tentativas de isolamento de vírus, embora espécimes pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, que incluem espécies (*Hg. janthinomys*, *Hg. albomaculatus*, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. chloropterus*) conhecidamente vetoras em outras regiões do país tenham sido capturados em números expressivos, atingindo 20,26% do total de mosquitos pesquisados<sup>5,7,9</sup>.

A circulação do vírus amarílico em áreas endêmicas e o deslocamento rápido e contínuo de pessoas que freqüentam aquelas áreas, com finalidade de trabalho ou de lazer, determinam o aparecimento de casos importados em regiões indenes.

A área com suspeita de transmissão autóctone é classificada, segundo a FUNASA, como área epizootica ou de transição para transmissão de FA. A detecção de dois prováveis casos autóctones na região, a presença de anticorpos para flavivírus em população humana em áreas sem registro de transmissão recente da doença, a distribuição de mosquitos vetores e a ocorrência de primatas não humanos, hospedeiros naturais e amplificadores do vírus amarílico, sugerem a possibilidade de deslocamento do vírus FA com ampliação da área de transição.

O aparecimento de casos humanos sugere a ocorrência de contato de uma população não protegida, com uma circulação viral silenciosa, restrita a ambiente silvestre. São necessários mais estudos que possibilitem a compreensão de fatores que determinam o aparecimento de casos e a expansão da transmissão do vírus para outras áreas, não consideradas enzoóticas. A impossibilidade de se pesquisar primatas não humanos e a não detecção de mosquitos naturalmente infectados inviabilizou a determinação do local de transmissão silvestre.

Há que se considerar ainda o risco de reurbanização da doença, uma vez que, os vetores comprovado e potencial, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* respectivamente, encontram-se amplamente disseminados pelo país<sup>7</sup>. As epidemias de Dengue na maioria dos estados refletem a presença maciça do *Aedes aegypti*<sup>7</sup>.

Apesar da disponibilidade de uma vacina com eficácia de 99% e imunidade duradoura (mínimo de 10 anos)<sup>7</sup>, pessoas não imunizadas são atingidas pela virose quando adentram áreas enzoóticas para atividades de trabalho (desmatamentos para abertura de estradas, cultivos, moradia e mineração) ou de lazer (turismo ecológico, caçada ou pescaria). Indivíduos infectados nesses ambientes, podem trazer o vírus para áreas urbanas onde, na presença de altos índices de infestação de vetores, podem desencadear a transmissão da forma urbana da doença. Embora os casos de FA sejam esporádicos, não se deve ignorar o risco de se estabelecer sua reurbanização, com graves conseqüências para a saúde pública. No estado de São Paulo, campanhas de vacinação foram intensificadas no período de 1986 a 2000, em decorrência do registro de casos importados de FA<sup>10</sup>. As campanhas foram expandidas para as regiões Norte e Leste do Estado, especialmente em áreas ribeirinhas dos Rios Grande e Paraná. Dada a existência da forma silvestre da doença, que impossibilita a eliminação de vetores, de hospedeiros e, conseqüentemente, do vírus, não se pode admitir um relaxamento nas atividades de vigilância epidemiológica e sanitária; é necessário que as medidas de proteção à população humana sejam uma constante nos programas de saúde pública.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários das Seções: Vírus Transmitidos por Artrópodos, Culturas Celulares e Biotério, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Rocco, I. M.; Katz, G. e Tubaki, R. M - Jungle yellow fever in São Paulo state, Brazil: human autochthonous cases. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 201 - 206, 2003.

**ABSTRACT.** The authors relate the occurrence and the results of the investigations of human cases of jungle yellow fever (YF) in São Paulo State. In 2000, 7 suspect cases of YF were confirmed; 5 of them were imported from other States and 2 probably autochthonous, from areas located at the banks of the Grande river, at Northwest of the São Paulo State. Four of them evolved into death. Serological survey was done among 630 inhabitants of 13 riverside Counties and entomological research was performed in the areas in which there was suspicion of autochthonous transmission. The confirmation of these cases was done by serological tests, virus isolation and molecular techniques. The 7 samples resulted positive for YF in at least one of the tests. All the 7 samples were reacted to YF in MAC-ELISA test. The virus was isolated in serum samples of 4 patients and no virus isolation was obtained from mosquitoes. The serological survey showed 5,23% of prevalence of YF antibodies. The detection of two cases of jungle YF in São Paulo State confirm the tendency that the transmission has migrated to the South of Brazil. The presence of antibodies for YF among population in areas where earlier transmission was not reported until now, reveals the risk of the reurbanization of the disease.

**KEY WORDS.** flavivirus, jungle Yellow Fever; human cases; eco-epidemiological survey

#### REFERÊNCIAS

1. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol- chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, 162: 156-159, 1987.
2. Clarke, D.H.; Casals, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 7: 561-573, 1958.
3. Coimbra, T.L.M. et al. Investigação epidemiológica de casos de febre amarela na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 21: 193-199, 1987.
4. Duarte, H.H.P. et al. Yellow fever outbreak in Minas Gerais State, Brazil, 2001. 12<sup>th</sup> National Meeting of Virology and 4<sup>th</sup> Mercosul Meeting of Virology. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 2, suppl. 1, pg 87, 2001.
5. Forattini, OP. **Culicidologia Médica, vol.2: Identificação, Biologia, Epidemiologia** – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
6. Fulton, F.; Dumbell, K.R. The serological comparison of strains of Influenza virus. **J. gen. Microbiol.**, 3: 97-111, 1949.
7. FUNASA, **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, Fundação Nacional de Saúde, 1999.
8. FUNASA, [http://.www.funasa.gov.br].
9. Hervé, J-P. et al. A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana. **Hiléia Médica**, 7(1):31-40, 1985.
10. Informe técnico sobre febre amarela – São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, 2002.
11. Jennings, A.D. et al. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine associated human encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, 169: 512-518, 1994.
12. Kuno, G. et al. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 36: 153-159, 1987.
13. Monath, T.P. Yellow Fever. In: TP. Monath Ed, **The Arboviruses: epidemiology and ecology**, vol. V, Florida: CRC Press, 1989.
14. Nassar, E.S. et al. Jungle Yellow fever: clinical and laboratorial studies emphasizing viremia on an human case. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 37(4): 3337-341, 1995.
15. Nobre, A. et al. Febre Amarela e Dengue no Brasil: Epidemiologia e controle. **Rev. Soc. Brasil. Medicina Tropical**, 27: 59-66, 1994.
16. Shope, R.E.; Sather, G.E. Arboviruses. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infectious**. Lennette, EH & Schimidt NJ., eds. 5ed. Washington, DC, American Public Health Association, 1979, p. 767-814.
17. Vasconcelos, P.C. et al. Yellow fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and Epidemiological findings, **Emerging Infectious Disease** 7 (3): 5465-569, 2001.
18. Vasconcelos, P.F.C. et al. An epidemic of sylvatic yellow fever in the Southeast Region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and entomologic findings. **Am. J. trop Med. Hyg.**, 57(2):132-137, 1997.
19. Vasconcelos, P.F.C. et al. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura**, 44(2/3): 117-124, 1992

Recebido em 27/05/2003; Aprovado em 12/11/2003