



Diagnóstico laboratorial de infecção pelo Vírus da Febre Amarela

Setembro de 2018

O vírus da febre amarela pertence ao gênero *Flavivirus* e se encontra relacionado a outros vírus do mesmo gênero como os da dengue, Zika, encefalite japonesa e encefalite do Nilo Ocidental. Pode ser transmitido a humanos principalmente por vetores selváticos, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* y *Sabethes*, assim como também pelo mosquito *Aedes aegypti* (1-3). O espectro clínico da febre amarela varia desde uma infecção assintomática ou leve até um quadro grave com hemorragia e icterícia que pode ser fatal (1-4). A suspeita diagnóstica da febre amarela é baseada nas características clínicas, lugares y data de viagem do paciente (se o paciente é de um país ou área não endêmica) e as atividades e a história epidemiológica do lugar onde possivelmente ocorreu a infecção. Contudo, o diagnóstico específico e a confirmação dos casos requerem análises laboratoriais.

A medida mais importante de prevenção contra a febre amarela é a vacinação. Ensaios clínicos têm demonstrado que 80-100% das pessoas vacinadas desenvolvem uma imunidade efetiva após 10 dias, e 99% após 30 dias. Apesar da vacina contra a febre amarela ser segura e raramente causar efeitos adversos, as contraindicações e práticas seguras de imunização devem ser respeitadas (1-3).

Tipo de amostra e procedimentos laboratoriais

O diagnóstico da febre amarela é realizado mediante métodos virológicos (a saber, detecção do genoma viral, de antígenos virais ou isolamento viral) e/ou serológicos (ELISA, PRNT) (5-7). Igualmente a qualquer teste laboratorial, os resultados devem ser considerados de acordo com o contexto epidemiológico e clínico.

Considerações de biossegurança

Todas as amostras biológicas (sangue total, soro ou tecido fresco) são consideradas potencialmente infecciosas (8). Todo o pessoal de laboratório que entrar em contato com a amostra, deverá estar vacinado contra a febre amarela e utilizar os equipamentos de proteção pessoal adequados. Mesmo assim, é recomendado realizar qualquer procedimento dentro de cabines de biossegurança classe II certificadas, extremado as medidas para evitar acidentes por punção. Para o manejo de amostras de primatas não humanos deve-se realizar una estrita avaliação de risco segundo as regulações nacionais e os manuais de biossegurança de cada laboratório, considerando ademais o uso de cabines de segurança biológica do tipo III.

Diagnóstico virológico

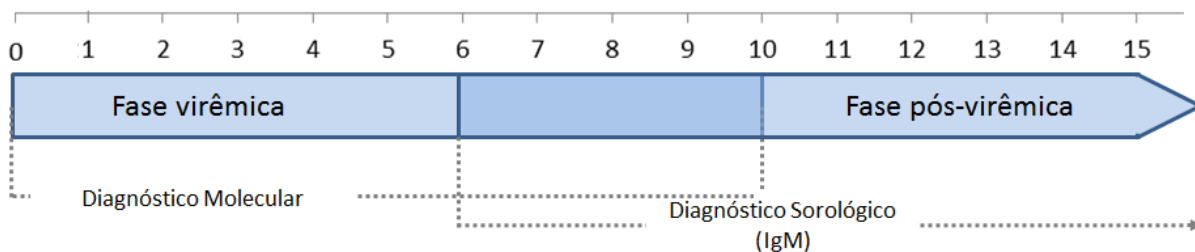
- **Diagnóstico molecular:** Durante os primeiros 10 dias desde o início dos sintomas (fase virêmica), ou mesmo por mais de 10 dias em casos graves, é possível realizar a detecção do RNA viral em amostras de soro mediante métodos moleculares, como a Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR, por suas siglas em inglês) convencional (ponto



final) ou tempo real (Figura 1). Um resultado positivo por provas moleculares (sendo utilizados os controles e interpretação adequados) confirma o diagnóstico para febre amarela.

- **Isolamento viral:** o isolamento viral pode ser realizado por inoculação intracerebral em camundongos ou em cultivo celular (células Vero ou C6/36; pode ser realizado em biocontenção de NB 2). Por sua complexidade, esta metodologia é pouco utilizada como ferramenta de diagnóstico de primeira linha. Contudo, a capacidade de isolamento viral é importante para caracterização das linhagens circulantes, para produzir reagentes para diagnóstico e para estudos e pesquisa.
- **Imunohistoquímica:** O estudo histopatológico com imunohistoquímica em cortes de fígado (e outros tecidos) constitui o “método padrão ouro” para o diagnóstico da febre amarela em casos fatais. Adicionalmente, os métodos moleculares a partir de amostras de tecido fresco ou fígado em formaldeído (embebidos em parafina) podem também ser utilizados para a confirmação de casos fatais.

Figura 1. Indicações para o diagnóstico segundo o número de dias desde o início dos sintomas



Diagnóstico sorológico

- **Deteção de IgM:** Os anticorpos IgM contra o vírus da febre amarela podem ser detectados por ELISA (principalmente, ELISA de captura de IgM, MAC-ELISA por sua sigla em inglês) ou qualquer outro imunoenensaio (por exemplo, imunofluorescência indireta). Atualmente, não existem disponíveis kits comerciais de ELISA IgM para detecção de febre amarela. Por isto, os protocolos “caseiros” que utilizam antígenos completos purificados são amplamente utilizados (7-9). **Tem sido descrita reação cruzada significativa entre os testes para IgM de febre amarela com outros flavivírus, em particular durante infecções secundárias por flavivírus. Assim, em áreas onde outros flavivírus co-circulam (em particular vírus da dengue e do Zika), a probabilidade de reatividade cruzada é alta.** Além disso, como com qualquer testes para IgM, um resultado positivo em uma única amostra é apenas **presumível** de uma infecção aguda. A confirmação laboratorial requer soroconversão em amostras pareadas (agudas e convalescentes coletadas com pelo menos 1 semana de diferença) na ausência de soroconversão para outros flavivírus relevantes (ver abaixo). Finalmente, nas áreas onde são realizadas campanhas de vacinação ativas, a detecção de anticorpos pós-vacinais pode ocorrer, pelo qual o diagnóstico deve ser cuidadosamente interpretado (ver abaixo a seção *Resposta imune pós-vacinal*).
- **Outras técnicas sorológicas:** Estes métodos incluem a detecção de anticorpos IgG por ELISA e anticorpos neutralizantes pela técnica de neutralização por redução de placa (PRNT, por sua



sigla em inglês). Em geral, o PRNT oferece melhor especificidade que a detecção de anticorpos IgM e IgG totais. No entanto, **a reatividade cruzada entre os flavivírus também foi documentada nos ensaios de neutralização**, . Portanto, é recomendável realizar esta técnica com um painel flavivírus. A confirmação laboratorial requer uma soroconversão específica de febre amarela ou um aumento de mais de 4 vezes nos títulos de anticorpos em amostras pareadas (ver abaixo). Também pode ocorrer a detecção de anticorpos induzidos por vacina e os ensaios laboratoriais devem ser interpretados com cuidado (ver abaixo a seção *Resposta imune pós-vacinal*).

Algoritmo de diagnóstico, interpretação de resultados por sorologia e diagnóstico diferencial

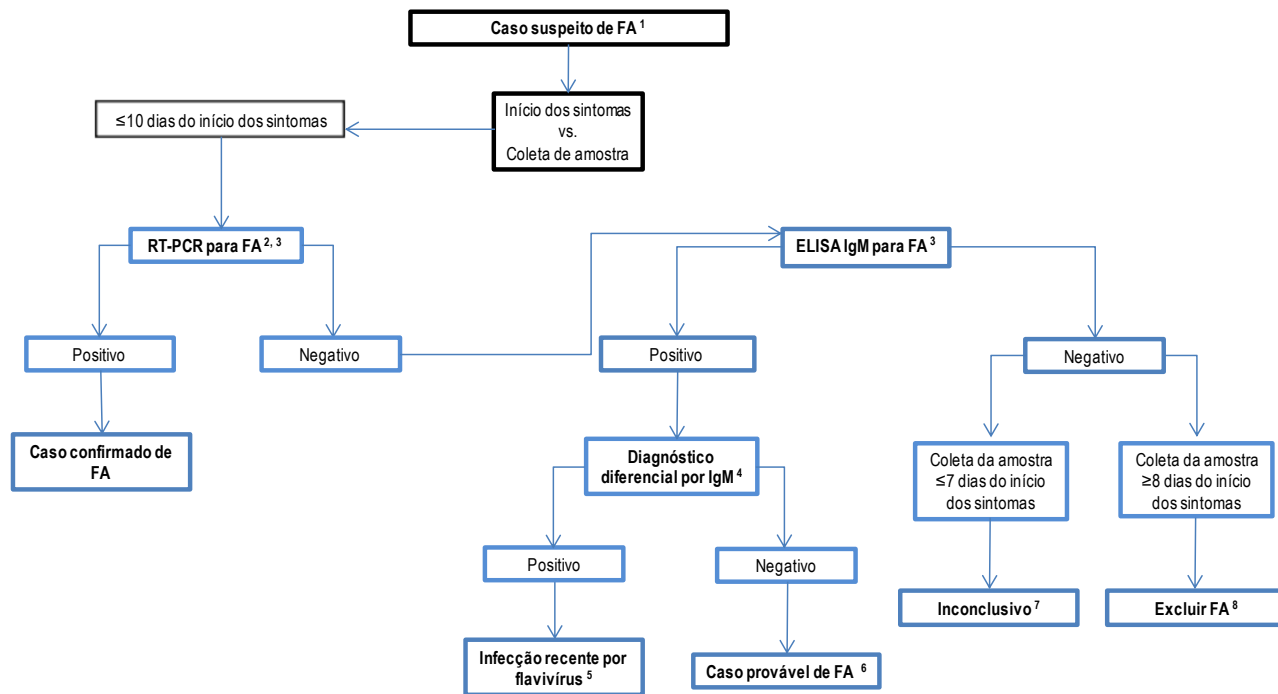
As técnicas sorológicas geralmente apresentam reatividade cruzada em infecções por flavivírus (em particular, em infecções secundárias). Portanto, **o uso da técnica de RT-PCR deve ser priorizado** (Figura 2). Porém, um resultado negativo por RT-PCR não descarta a infecção por isso a amostra deve ser analisada posteriormente por sorologia.

As amostras com resultado IgM positivo devem ser analisadas por testes diferenciais de IgM, particularmente em áreas onde a co-circulação do vírus da febre amarela com outros flavivírus (dengue, encefalite de St. Louis, Zika e outros do complexo da encefalite japonesa) está documentada e existe a probabilidade da população ter sido previamente infectada com um ou mais desses vírus.

Um teste diferencial não positivo não permite confirmar ou descartar uma infecção pelo vírus da febre amarela; no entanto, não o exclui. Portanto, em áreas não endêmicas ou em áreas onde nenhuma circulação recente do vírus da febre amarela foi descrita, este devem ser investigado. Um teste com resultado IgM positivo para febre amarela com testes diferenciais negativos deve ser interpretado como um provável caso de febre amarela. A confirmação por sorologia desses casos pode ser obtida usando amostras pareadas. Um teste IgM negativo para a febre amarela não é conclusivo para amostras coletadas até o 7º dia após o início dos sintomas. A febre amarela pode ser descartada se o teste for negativo IgM em uma amostra coletada a partir do 8º dia após o aparecimento dos sintomas.

Por outro lado, o diagnóstico diferencial da febre amarela deve incluir outras síndromes febris e febril-ictéricas como dengue, leptospirose, malária, febre tifoide, infecções por rickettsias, hepatite tóxicas ou viral e febres hemorrágicas boliviana, brasileira, argentina e venezuelana, entre outras, dependendo do perfil epidemiológico de país ou área afetada (1).

Figura 2. Algoritmo para confirmação laboratorial de casos de Febre Amarela (FA)



- ¹ Sem histórico de vacinação para FA nos últimos 30 dias ou com histórico de vacinação desconhecido.
- ² Os laboratórios que possuem somente capacidade para realizar somente RT-PCR ou ELISA IgM devem processar as amostras com a técnica disponível. Os resultados devem ser interpretados de acordo com o algoritmo.
- ³ A sensibilidade da RT-PCR é maior nos primeiros 10 dias do início dos sintomas. Porém, detecção até 14 dias tem sido decrita, em particular em casos graves (e fatais).
- ⁴ Deve incluir o vírus da dengue assim como outros flavivírus dependendo de la situação epidemiológica da região/país.
- ⁵ Considerar a possibilidade de realizar PRNT em um laboratório de referencia. Este resultado não descarta a febre amarela. Portanto, em áreas onde não foi descrita a circulação recente de FA, este resultado deve ser investigado.
- ⁶ Um resultado positivo por IgM em uma amostra única não é confirmatório. Devem ser utilizados critérios clínicos e epidemiológicos adicionais para a interpretação final do caso, em particular em áreas onde não foi descrita circulação recente de FA.
- ⁷ Solicitar uma segunda amostra e processá-la de acordo com o algoritmo.
- ⁸ Investigar os casos e realizar o diagnóstico clínico diferencial.

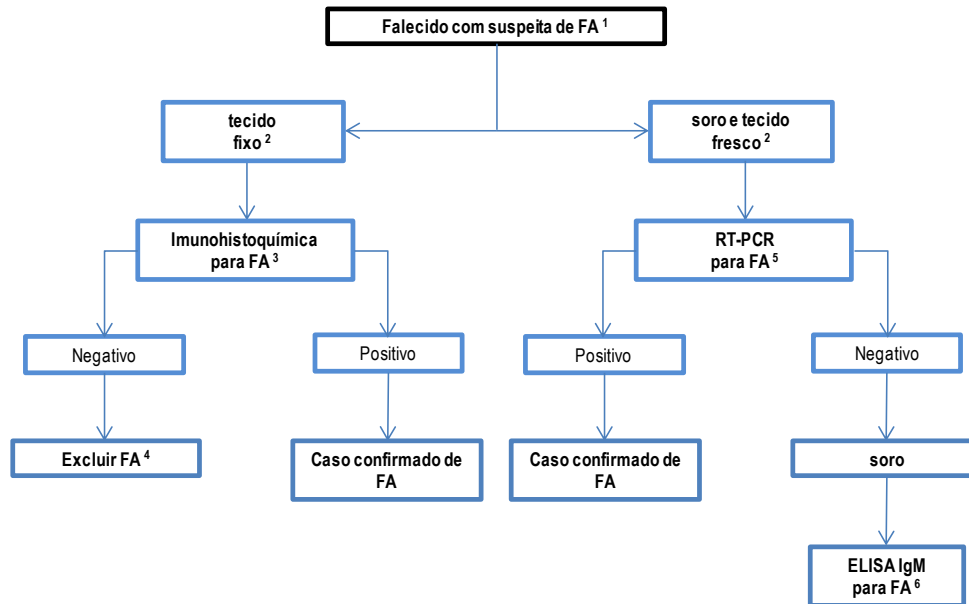
Casos fatais suspeitos de febre amarela

Em casos fatais suspeitos de febre amarela, as seguintes amostras devem ser coletadas independentemente do tempo decorrido desde o início dos sintomas:

- Soro para análise molecular e sorológica;
- Tecido fresco para testes moleculares (Deve ser garantido tecido hepático e renal; adicionalmente tecidos do baço, pulmão, cérebro e coração podem ser coletados);
- Tecido fixado para imunohistoquímica (mesmos tecidos que acima).

O algoritmo para confirmar casos fatais encontra-se na Figura 3.

Figura 3. Algoritmo para confirmação laboratorial de casos fatais de Febre Amarela (FA)



- ¹ Sem histórico de vacinação de FA nos últimos 30 dias ou com histórico de vacinação desconhecido.
² Amostras de tecido fresco e fixo devem ser coletadas (em particular, fígado e rim).
³ A imunohistoquímica deve ser realizada em tecido hepático e renal e, se possível, em outros tecidos.
⁴ Investigar os casos e realizar o diagnóstico clínico diferencial.
⁵ RT-PCR deve ser realizada com RNA extraído de soro e tecido fresco.
⁶ Seguir a interpretação descrita no algoritmo para confirmação por laboratório de casos de Febre Amarela (Figura 2).

Resposta imune pós-vacinal

A vacinação induz uma viremia relativamente baixa que diminui após 4 a 7 dias. Simultaneamente, desenvolve-se uma resposta do tipo IgM que não pode ser diferenciada da resposta de IgM induzida por uma infecção natural. Aproximadamente 10 dias após a vacinação, a pessoa é considerada protegida contra uma infecção natural. Assim, a resposta vacinal IgM pode ser detectada ao redor do dia 5 em diante, com um pico ocorrendo geralmente 2 semanas após a vacinação. Posteriormente, os níveis desses anticorpos tendem a diminuir. Em uma proporção significativa de pessoas vacinadas, a resposta IgM pode ser detectada até um mês após a vacinação e, em alguns casos por até 3-4 anos (11). Por outro lado, os anticorpos neutralizantes induzidos pela vacinação podem ser detectados por várias décadas. Devido a tudo isto, **a interpretação dos resultados sorológicos em indivíduos vacinados é complexa, particularmente aqueles que foram recentemente vacinados e, portanto, os resultados devem ser cuidadosamente avaliados.**

Em pessoas recém-vacinadas (<30 dias) que desenvolvem sintomas clássicos de febre amarela, a vigilância deve se concentrar na diferenciação entre infecções pelo vírus selvagem e amostra vacinal (12-14). Os eventos supostamente atribuíveis a vacinação ou imunização (ESAVI) associados à vacina da febre amarela são raros (~ 1,6 casos por 100.000 doses de vacina). Os ESAVI mais comuns são doenças viscerotrópicas, doenças neurológicas e reações de hipersensibilidade grave. Nas áreas



endêmicas de febre amarela, a diferenciação entre infecções de tipo selvagem e ESAVIs exige a confirmação da presença do vírus vacinal da febre amarela (cepa 17D) por sequenciamento, técnica geralmente disponível apenas em laboratórios de referência (12-14).

Conservação de amostra

- Manter o sangue total (colatado em tubo EDTA) ou soro (coletado em tubo seco) refrigerado (2 a 8 °C) se serão processados (ou enviados a um laboratório de referência) dentro de 48 horas.
- Manter o soro congelado (-10 a -20 °C) se for processado após 48 horas ou num período não superior a 7 dias.
- Manter o soro congelado (-70 °C) se for processado mais de uma semana após a coleta. A amostra se conserva adequadamente a -70 °C por longos períodos de tempo. Recomenda-se separar as amostras em pelo menos duas alíquotas.
- Evitar múltiplos ciclos de congelamento – descongelamento.
- Amostras de tecido fresco (aproximadamente 1 cm³) podem ser usadas para o diagnóstico molecular. Congelar a -70 °C e enviar a um laboratório de referência em gelo seco. Se possível, enviar o tecido fresco com gelo reciclável. As amostras de tecido fresco também podem ser armazenadas em uma solução estabilizadora de RNA e enviadas à temperatura ambiente
- Para o estudo histopatológico e para imunohistoquímica, a amostra de tecido (aproximadamente 1 cm³) deve ser preservada em formalina tamponada e enviada ao laboratório de patologia à temperatura ambiente. Os tecidos hepáticos e renais são as amostras de escolha para histopatologia e imunohistoquímica. Amostras de baço, cérebro, pulmão, coração e linfonodos também podem ser úteis.

Envio de amostra por via aérea ao laboratório de referência

Alguns aspectos importantes a considerar para o envio de amostra por via aérea (15):

- Garantir a cadeia de frio com gelo seco preferivelmente ou com gelo recicláveis. Usar sempre o sistema de tripla embalagem.
- Enviar as amostras preferivelmente dentro das primeiras 48 horas.
- As amostras originais devem ser embaladas, marcadas, etiquetadas apropriadamente e documentadas como **categoria B**.
- Adicionar ao envio a ficha clínica e epidemiológica completa.
- Os tecidos fixados em formaldeído devem ser empacotados separados dos tecidos frescos e as amostras de sangue, já que o formaldeído é volátil.



Referencias

1. Pan American Health Organization (PAHO). Control of yellow fever, field guide, 2005. Disponível em:
http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/fieldguide_yellowfever.pdf
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/OPS-Guia-practica-fiebreamarilla-2005.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual for the monitoring of yellow fever virus infection. Avril 2004. Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68715/1/WHO_IVB_04.08.pdf
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Travelers' Health. Yellow Fever prevention, content updated January 4 2017. Disponível em:
<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow Fever: Symptoms and Treatment. 13 de agosto de 2015. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html>
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow Fever: Clinical & Laboratory Evaluation. 21 de agosto de 2015. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/yellowfever/healthcareproviders/healthcareproviders-clinlabeval.html>
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Yellow fever laboratory diagnostic testing in Africa. Interim guidance. Geneva: World Health Organization; 2016. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246226/1/WHO-OHE-YF-LAB-16.1-eng.pdf>
7. Domingo et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory. Emerg Microbes Infect. 2018 Jul 12;7(1):129. doi: 10.1038/s41426-018-0128-8. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/s41426-018-0128-8>
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition, 2009. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf>
9. Basile AJ, et al. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus. J Virol Methods. 2015 Dec 1;225:41-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.08.025. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093415003055>



10. Lindsey et al. Ability to Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. *J Clin Microbiol.* 2017 Dec 26;56(1). pii: e01115-17. doi: 10.1128/JCM.01115-17. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/56/1/e01115-17.long>
11. Gibney, et al. Detection of Anti-Yellow Fever Virus Immunoglobulin M Antibodies at 3–4 Years Following Yellow Fever Vaccination (2012). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87(6), 1112–1115. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516084/pdf/tropmed-87-1112.pdf>
12. Pan American Health Organization (PAHO). Viscerotropic Disease Associated with Vaccination against Yellow Fever: Case Studies. Guide for Facilitator, 2013. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31366/9789275117538-eng.pdf>
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/173266/1/Enfermedad_viscerotropica_asociada_a_la_vacunacion.pdf
13. Organización Mundial de la Salud (OMS). Detection and investigation of serious adverse events following yellow fever vaccination. Guidance from an informal consultation of experts, 2010. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70251/1/WHO_HSE_GAR_ERI_2010.2_eng.pdf
14. Gershman et al. Viscerotropic disease: Case definition and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 30 (2012) 5038– 5058. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12006135>
15. International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations, 56th Edition. 2015. Disponível em: <https://www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Documents/infectious-substance-classification-DGR56-en.pdf>