

# Diagnóstico Laboratorial da Febre Amarela

Vinícius Lemes da Silva

**Seção de Virologia**

**Laboratório Central de Saúde Pública**

**Dr. Giovanni Cysneiros**

# Diagnóstico laboratorial

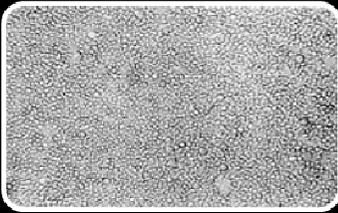
## Finalidades:

- Confirmação laboratorial sorológica e/ou virológica e/ou histopatológica da doença de casos sintomáticos ou óbitos suspeitos
- Apoio aos inquéritos soropidemiológicos

# Diagnóstico Laboratorial da Febre Amarela

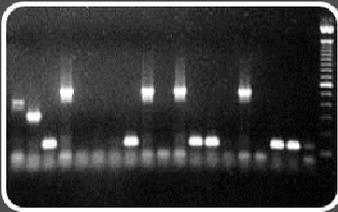
- Amostras para diagnóstico
  - Sangue, soro e fragmento de vísceras
- Diagnóstico laboratorial
  - Sorologia (detecção anticorpos)
  - Isolamento viral (detecção do vírus)
  - RT-PCR (detecção do RNA viral)
  - Histopatológico e imunohistoquímica (detecção de antígenos virais em tecidos formalizados)

# METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO DE F.A.



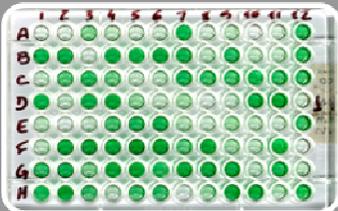
## Isolamento Viral

- Cultura de células de mosquito *A. albopictus* clone C6/36



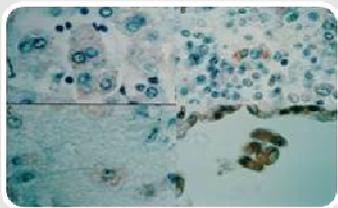
## Deteção de ácido nucléico viral

- RT-PCR, PCR em tempo real



## Sorologia

- Mac-ELISA, IgG-ELISA, IH



## Histopatologia e Imunohistoquímica

# Dados do paciente

- Ficha individual de investigação epidemiológica
  - Nome completo e endereço
  - Data da coleta e do início dos sintomas
  - Sinais e Sintomas
  - Informações epidemiológicas
  - Situação vacinal, exames inespecíficos
- Ficha do GAL

# Rotulagem

- Nome do exame
- Nome do paciente completo e por extenso
- Data da coleta, natureza da amostra e número da amostra (se 1º ou 2º)
- Usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação e com letra legível

**Febre Amarela**  
**Vinicius Lemes da Silva**  
**20/03/12- Soro (1ª)**

# Técnicas Sorológicas

- MAC-ELISA IgM
  - Determinação de infecção aguda ou recente por Febre Amarela
- ELISA IgG / Inibição da hemaglutinação
  - Determinação de infecção passada
  - Determinação de resposta secundária
  - Inquéritos epidemiológicos

# Coleta de amostras para Sorologia

- Coletar assepticamente 10 ml de sangue com seringa ou tubo a vácuo sem anticoagulante previamente identificado
- Retração do coágulo: 30 minutos
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos
- Separar o soro: 2 a 4 ml
- Tubos de amostragem polipropileno 12x75mm
  - Tampa de rosca
  - Lacrar com parafilm
- Conservar em geladeira por no máximo 72 horas (manuseio) ou congelador a -20°C (armazenar)

# Mac- Elisa

- Sorologia:
  - Amostras coletadas após 7º dia de início de sintomas.
  - Pesquisa de anticorpos IgM\*\*

\*\*Vacinação anti-amarílica recente induz formação de IgM (Ver na ficha epidemiológica antecedentes vacinais).

# Conservação e transporte de amostras

Tipo de Análise	Conservação/ Transporte	Espécime/ Coleta
Detecção de anticorpos IgM (MAC-ELISA)	-20°C Gelo seco ou reciclável	Soro > 5 dias após o início dos sintomas
Detecção de anticorpos IgG / IgM (IH)	-20°C Gelo seco	Soro 1ª amostra: até 7 dias 2ª amostra: 14° - 30° dias (após o início dos sintomas)

# Interpretação dos resultados

- Resultado positivo:
  - Indica uma infecção em curso ou recente pelo vírus amarelo\*
  - Falsos negativos são comuns em soros de coleta precoce ou muito distantes do início da doença.

\*Dados clínicos e epidemiológicos confirmam a recente exposição ao vírus da Febre Amarela.

# Interpretação dos resultados

*“O resultado deve ser considerado presuntivo onde houver circulação de vários flavivírus. Se o MAC-Elisa for negativo para outros flavivírus (dengue, ilhéus, encefalite St. Louis, etc.) o resultado é altamente indicativo de febre amarela principalmente na presença de clínica e epidemiologia compatíveis. Em casos duvidosos deve-se levar em conta outros resultados de laboratório.”*

*Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela  
pág.33 - Brasília - 2004*

# Coleta para Diagnóstico Viroológico

- Soro para PCR
- Sangue para Isolamento viral
  - Coletar 1-2 ml sangue sem anticoagulante
  - Pós-óbito: punção cardíaca
  - Transferir 1 ml para o criotubo
  - Manter em nitrogênio
  - Encaminhar ao LACEN em Botijão com nitrogênio líquido

# Coleta para Diagnóstico Viroológico

- Criotubos – Especificação:
  - Fabricado em polipropileno (PP) livre de DNase, RNase, pirogênios e toxinas.
  - Tampa com rosca externa e com anel de vedação. Fundo redondo e auto-sustentável.
  - Graduado e com superfície para marcações de amostras.
  - Suporta temperaturas na faixa de  $-196^{\circ}\text{C}$  a  $+121^{\circ}\text{C}$ .
  - Esterilizados por raios gama.
  - Pacote com 100 peças.
  - Capacidade  $\pm 2$  ml.



# Coleta para Diagnóstico Viroológico

- Vísceras para isolamento viral
  - Coletar fragmentos pequenos ( $\pm 1 \text{ cm}^3$ )
  - Fígado, rins, baço, coração, linfonodo e cérebro
  - Ideal até 8 horas após o óbito
  - Lacrar com parafilm
  - Frasco estéril rosqueado resistente a temperaturas ultra baixas
  - Conservar a  $-70^\circ\text{C}$  ou no nitrogênio líquido
  - Embalar em sacos plásticos antes de serem colocados no nitrogênio

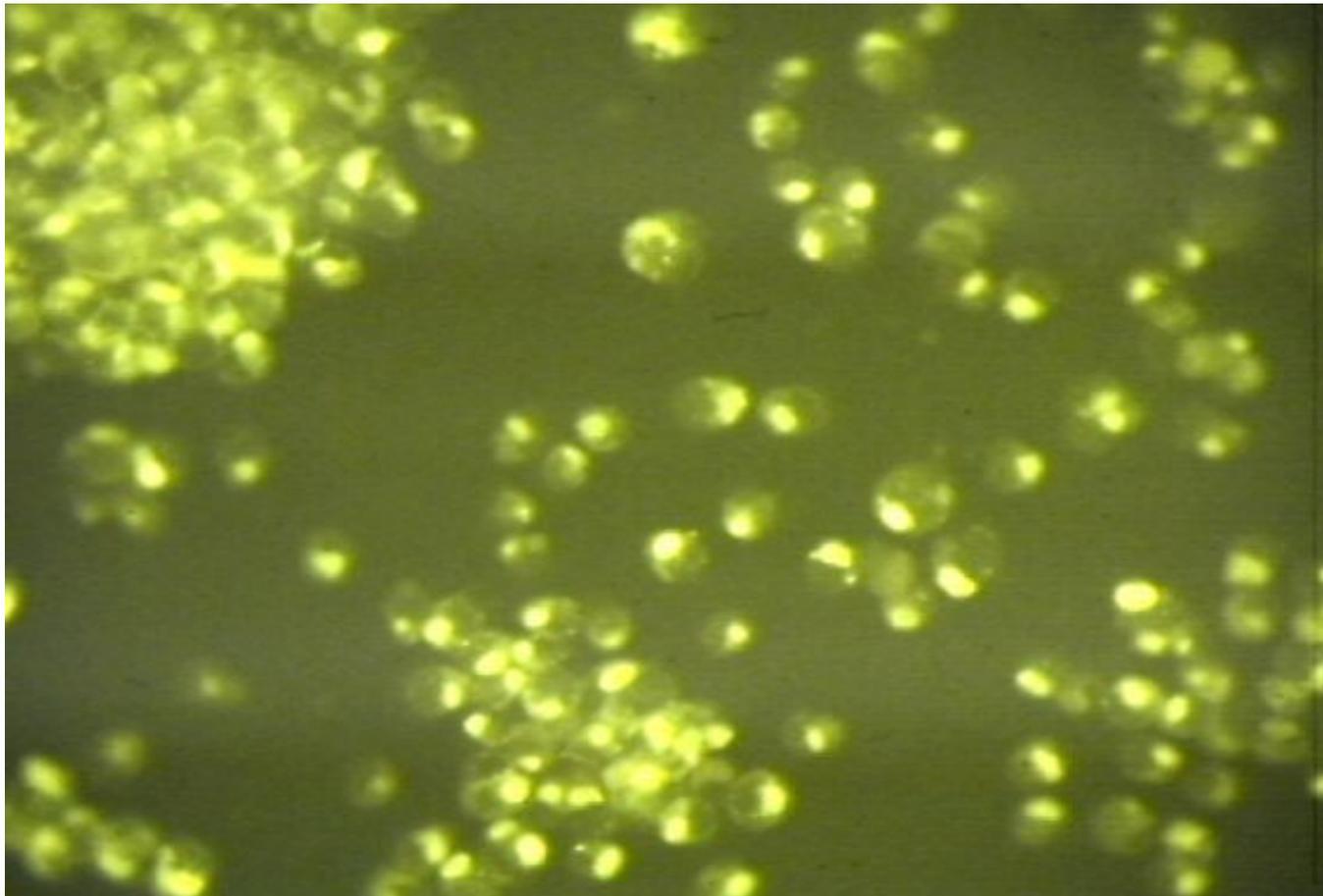
# Conservação e transporte de amostras

Tipo de Análise	Conservação/ Transporte	Espécime/Coleta
Isolamento viral	-70 °C Nitrogênio	Sangue Até 5 dias após o início dos sintomas
Isolamento viral	-70 °C Nitrogênio	Fragmentos de vísceras Até 8h após o óbito

# Isolamento Viral

- Amostra de sangue coletada no período virêmico (ideal 2º ao 5º dia de doença)
- Inoculação em cultura celular linhagem de célula C6/36 (mosquito *Aedes albopictus*)
- Imunofluorescência indireta com anticorpos policlonais/monoclonais

# IFI-Isolamento Viral



# Interpretação dos resultados

- Resultado positivo:
  - Confirma a etiologia.
- Resultado negativo:
  - Não exclui infecção por Febre Amarela.
  - A taxa de falsos negativos depende das condições de acondicionamento das amostras.

# RT-PCR

- **Metodologia mais rápida, sensível e específica**  
(Detecção do genoma viral por transcrição reversa do seu RNA em DNA complementar seguida de amplificação em cadeia pela polimerase (RT-PCR "in-house"))
- **Detecção do vírus em amostras biológicas**

# Conservação e transporte de amostras

Tipo de Análise	Conservação/ Transporte	Espécime/Coleta
RT-PCR	-70 °C Nitrogênio	Soro/sangue Até 5 dias após o início dos sintomas
RT-PCR	-70 °C Nitrogênio	Fragmentos de vísceras Até 8h após o óbito

# Interpretação dos Resultados

- Resultado: **Detectado**
  - Presença do patógeno (vírus)
- Resultado: **Não Detectado**
  - Sob investigação
- Resultado\*: **Inconclusivo**
  - \*Não houve amplificação específica do alvo pesquisado – sujeito à pesquisa por outra metodologia molecular

# Imunohistoquímica

- Detecção de antígeno viral em fragmentos de tecido (fígado, rins, baço, coração, linfonodos e cérebro) de casos fatais

# Conservação e transporte de amostras

Tipo de Análise	Conservação/ Transporte	Espécime/ Coleta
Histopatologia Imunohistoquímica	Temperatura ambiente Formalina tamponada a 10%	Fragmentos de vísceras(1cm <sup>3</sup> )

# Interpretação dos resultados

- Resultado Positivo
  - Confirma etiologia por Febre Amarela
- Resultado Negativo
  - Exclui Febre Amarela\*

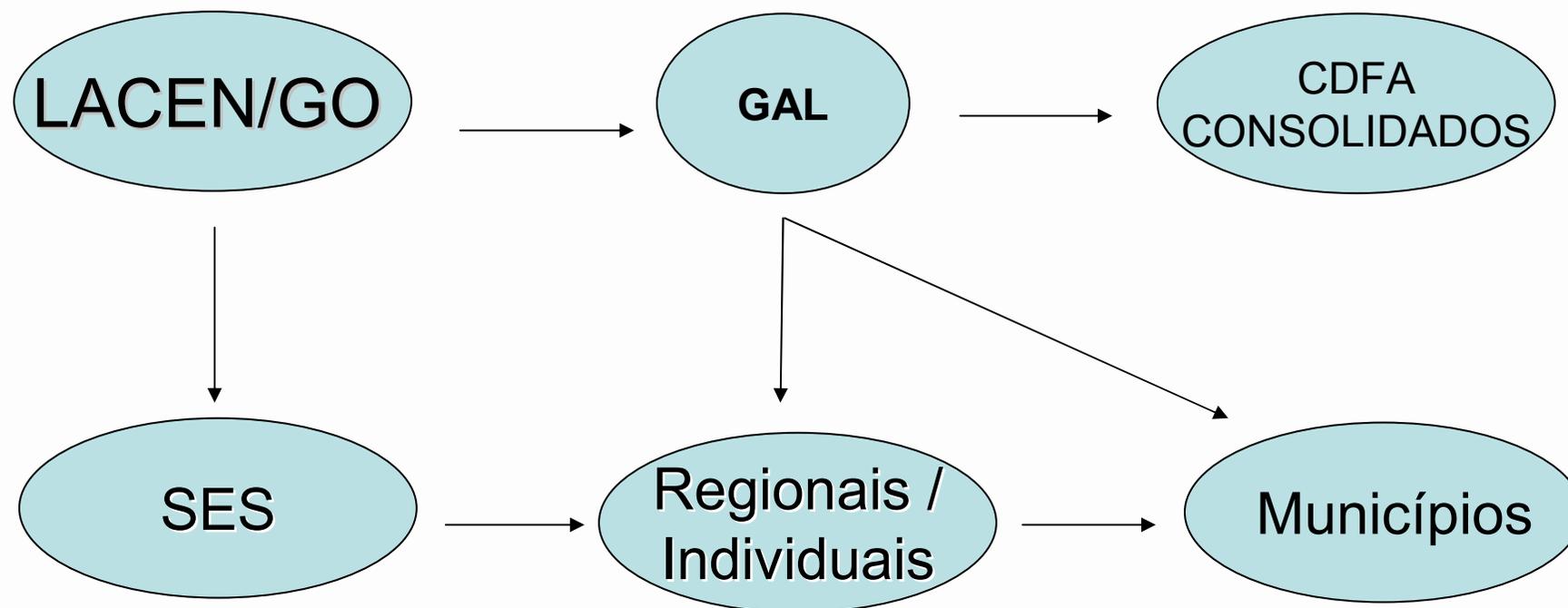
\* Condições da amostra: fragmento de tamanho significativo, grau de deterioração hepática.

# Diagnóstico Diferencial Febre Amarela

- Malária
- Púrpuras trombocitopênicas
- Meningococemia
- Dengue
- Doenças exantemáticas
- Sepses
- Leptospirose
- Influenza
- Febre tifóide

# Fluxo de Resultados

- Prazo de entrega de resultados: 7 dias.



# Avaliação das Amostras Enviadas ao LACEN

- DIFICULDADES ENCONTRADAS:
- I- QUANTO A ROTULAGEM
- II- QUANTO A QUALIDADE E QUANTIDADE DE SORO
- III- QUANTO AO ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE
- IV- QUANTO ÀS FICHAS EPIDEMIOLÓGICAS

# Avaliação das Amostras Enviadas ao LACEN

Principais erros no preenchimento das fichas epidemiológicas:

1. Falta de data de coleta (1ª e 2ª Amostra)
2. Falta das datas de início de sintomas, vacinas e nascimento
3. Falta de endereço, dados pessoais, sintomas, identificação de 2ª amostra e preenchimento do quadro de suspeita da doença.

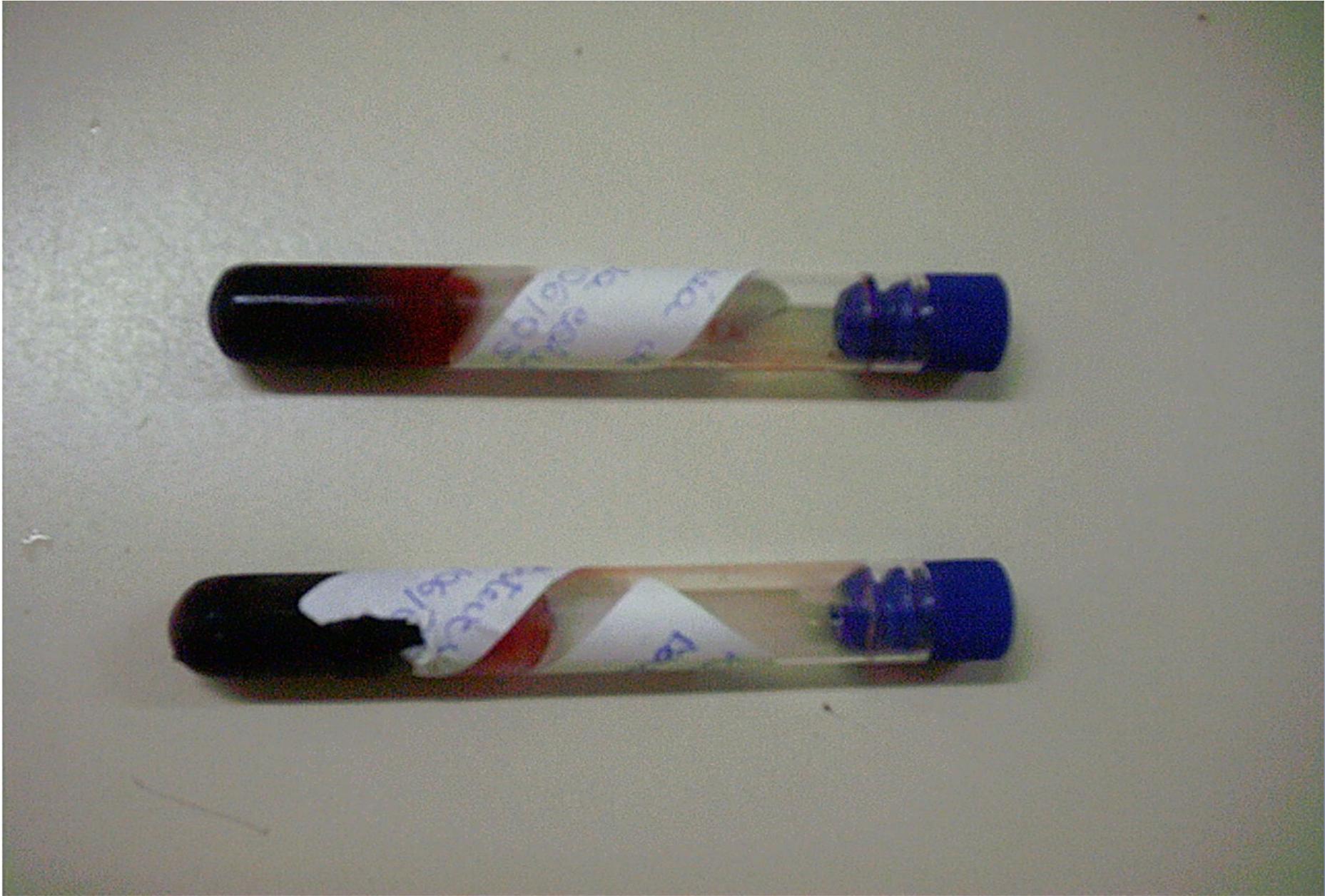
# Avaliação das Amostras Enviadas ao LACEN

4. Envio de fichas epidemiológicas sem soro correspondente e vice-versa
5. A 2ª amostra deve vir acompanhada da ficha epidemiológica indicando datas de coleta de S1 e S2.













# Avaliação das Amostras Enviadas ao LACEN

Todo material enviado ao LACEN deverá trazer em anexo uma lista com todos os nomes dos pacientes e respectivos materiais enviados. Após conferido ficará uma via no LACEN e outra volta para o município. Amostras sem fichas ou vice-versa serão devolvidas.

# Contatos

## Seção de Virologia IACEN-GO

Vinicius Lemes da Silva

- e-mail: [lacen.viro@gmail.com](mailto:lacen.viro@gmail.com)
- Fone: (62) 3201 9683
- Fax (62) 3201 3884
- Fone recepção: (62) 3201 3888