

Diagnóstico Laboratorial da Febre Amarela

Vinícius Lemes da Silva

Seção de Virologia

Laboratório Central de Saúde Pública

Dr. Giovanni Cysneiros



SECRETARIA DA SAÚDE
DO ESTADO DE GOIÁS



Diagnóstico laboratorial

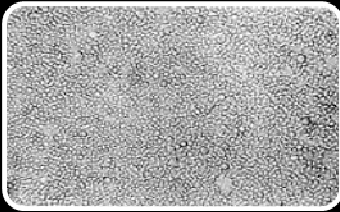
Finalidades:

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

Diagnóstico Laboratorial da Febre Amarela

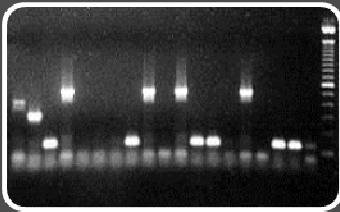
- Amostras para diagnóstico
 - Sangue, soro e fragmento de vísceras
- Diagnóstico laboratorial
 - Sorologia (detecção anticorpos)
 - Isolamento viral (detecção do vírus)
 - RT-PCR (detecção do RNA viral)
 - Histopatológico e imunohistoquímica (detecção de antígenos virais em tecidos formalizados)

METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO DE F.A.



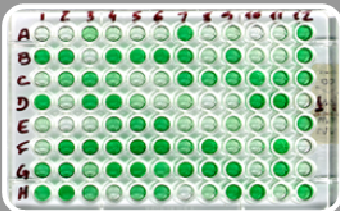
Isolamento Viral

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



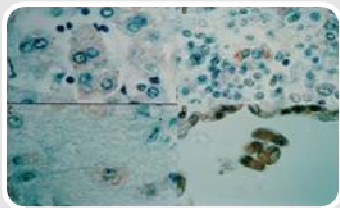
Deteção de ácido nucléico viral

- 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°C a $+121^{\circ}\text{C}$.
 - Esterilizados por raios gama.
 - Pacote com 100 peças.
 - Capacidade ± 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°C ou no nitrogênio líquido
 - Embalar em sacos plásticos antes de serem colocados no nitrogênio

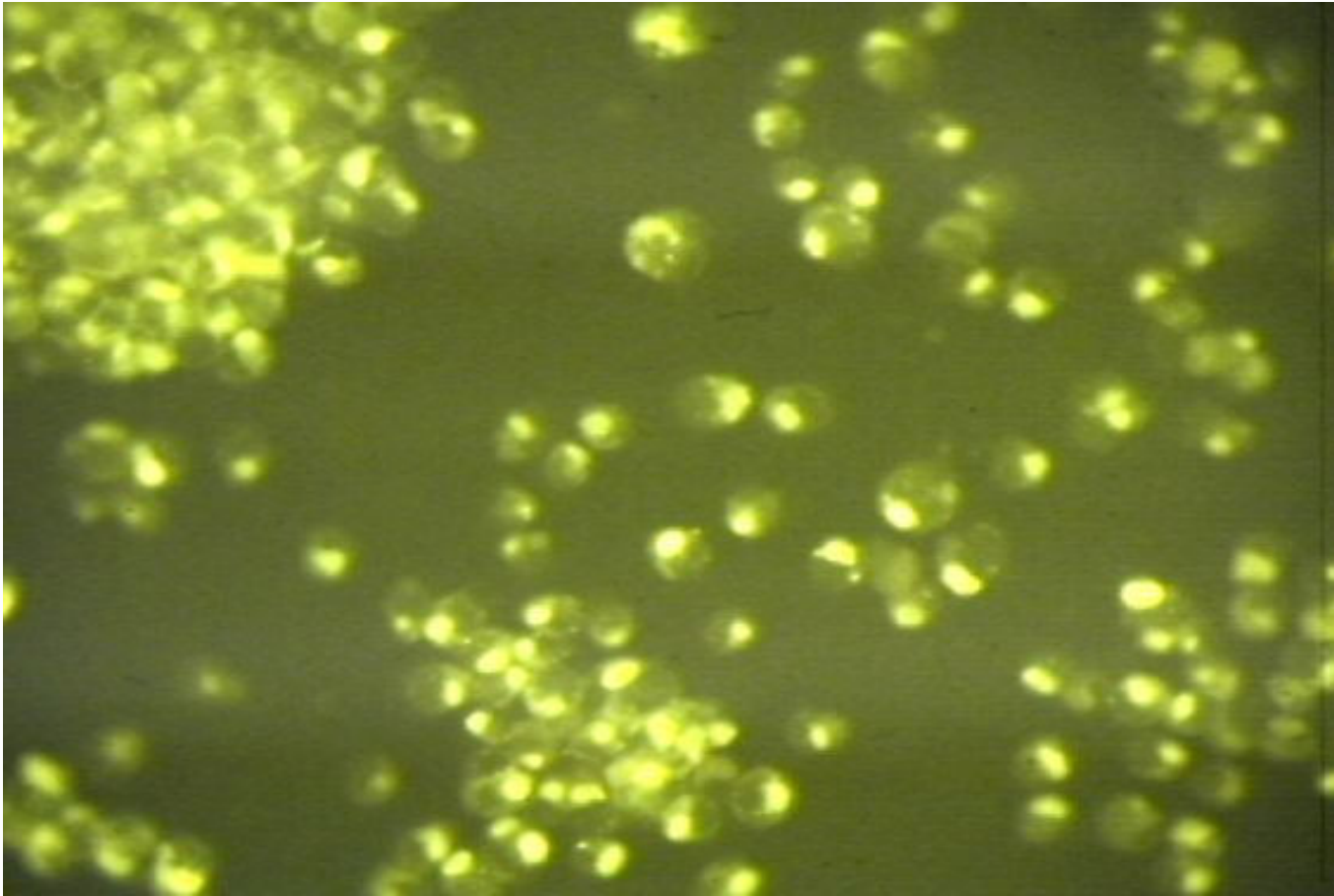
Conservação e transporte de amostras

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 ³)

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.

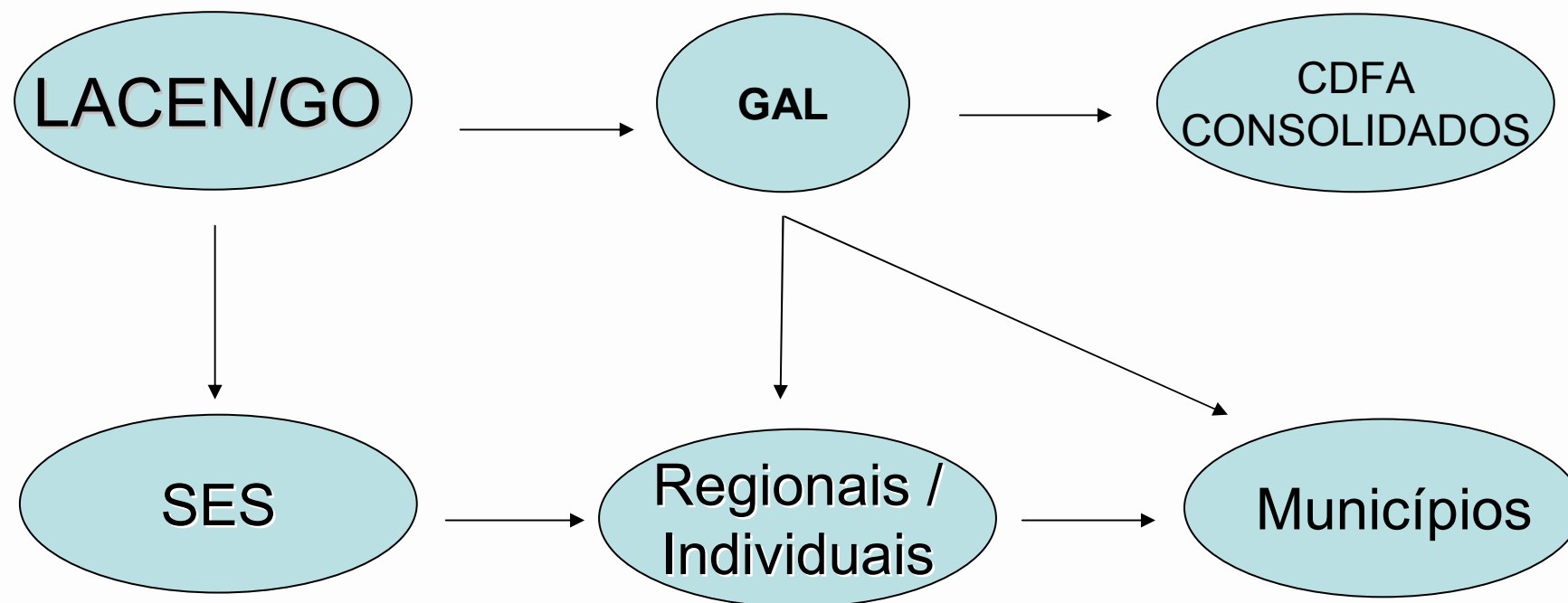
Diagnóstico Diferencial

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
- Fone: (62) 3201 9683
- Fax (62) 3201 3884
- Fone recepção: (62) 3201 3888