

PARANÁ



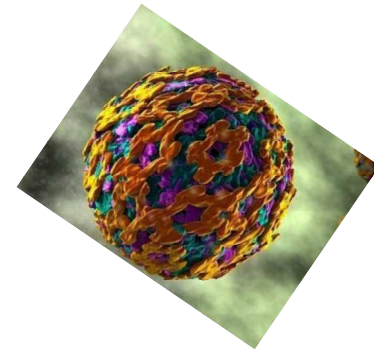
GOVERNO DO ESTADO

**DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL
DA
FEBRE AMARELA**

MAYRA M. PRESIBELLA
CARLA BORTOLETO
LACEN-PR

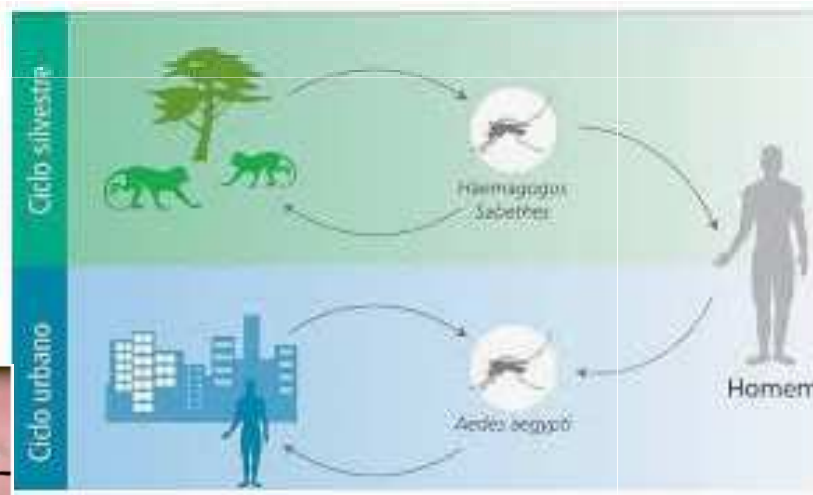
FEBRE AMARELA É UMA ARBOVIROSE

causada por um vírus RNA
transmitida por um mosquito



ARBOVÍRUS (ARTHROPODE-BORNE VIRUS):

Os vírus transmitidos por artrópodes, como os mosquitos. Não é uma classificação taxonômica, portanto vírus de diferentes famílias podem ser classificados como Arbovírus.



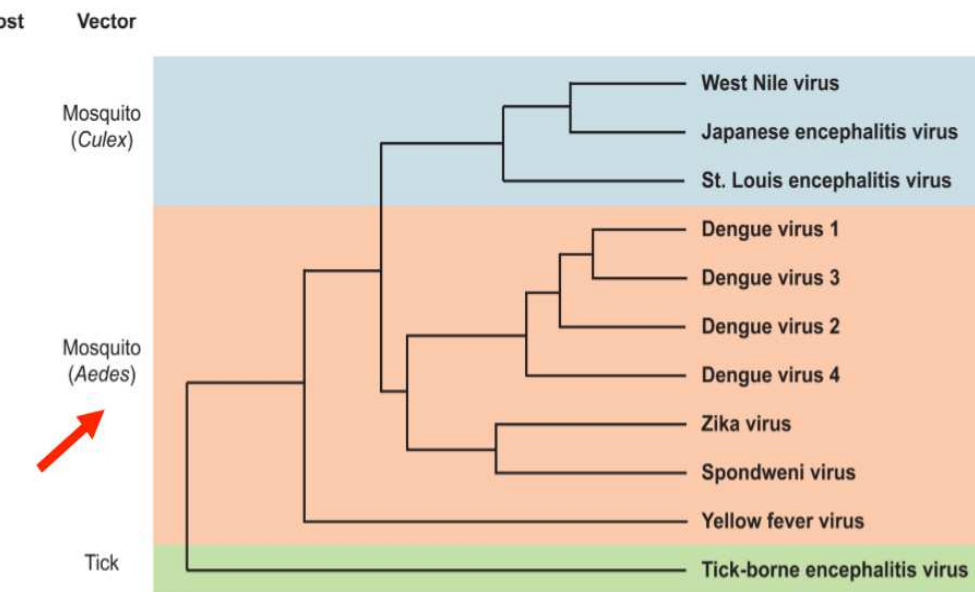
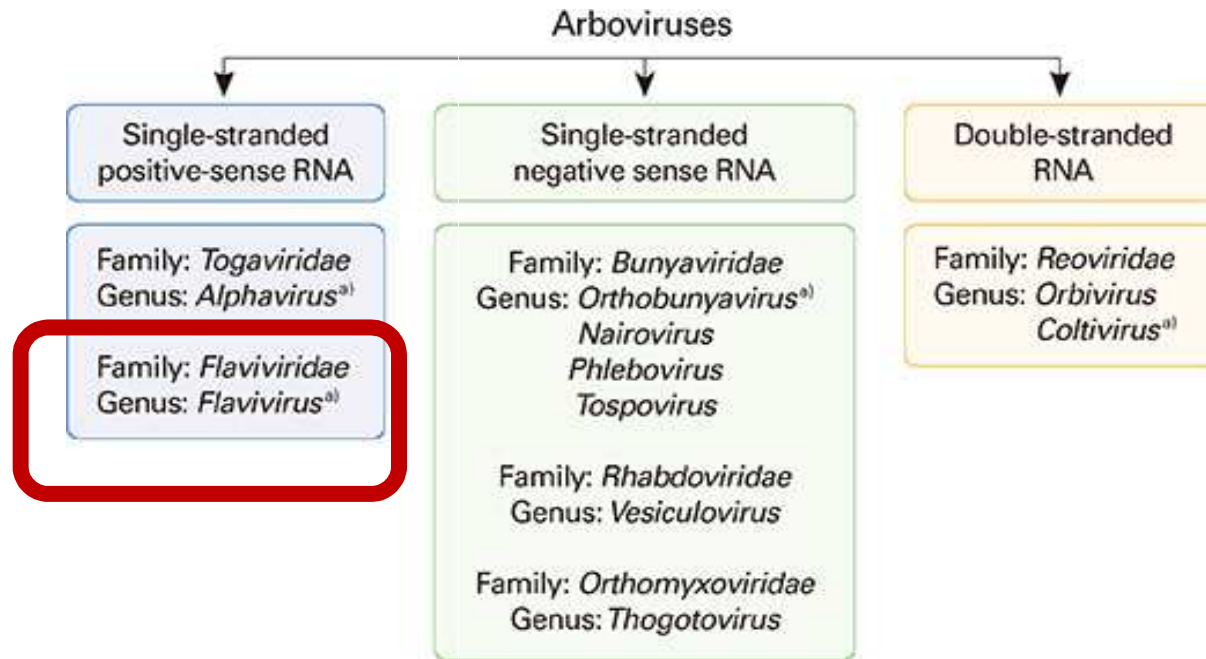
Sabethes sp.

Sabethes e Haemagogus



Aedes aegypti, um transmissor de vírus, incluindo o da febre amarela

Aedes (Stegomyia) aegypti



FAMÍLIA	VÍRUS (RNA)	TRANSMISSÃO
Alpha	Chik	Aedes
	Mayaro	Haemagogus
Flavi	Den	Aedes
	Zik	Aedes
	FA	Aedes e Haemagogus
	Saint Loius (enc. Japonesa)	Culex
	West Nile	Culex

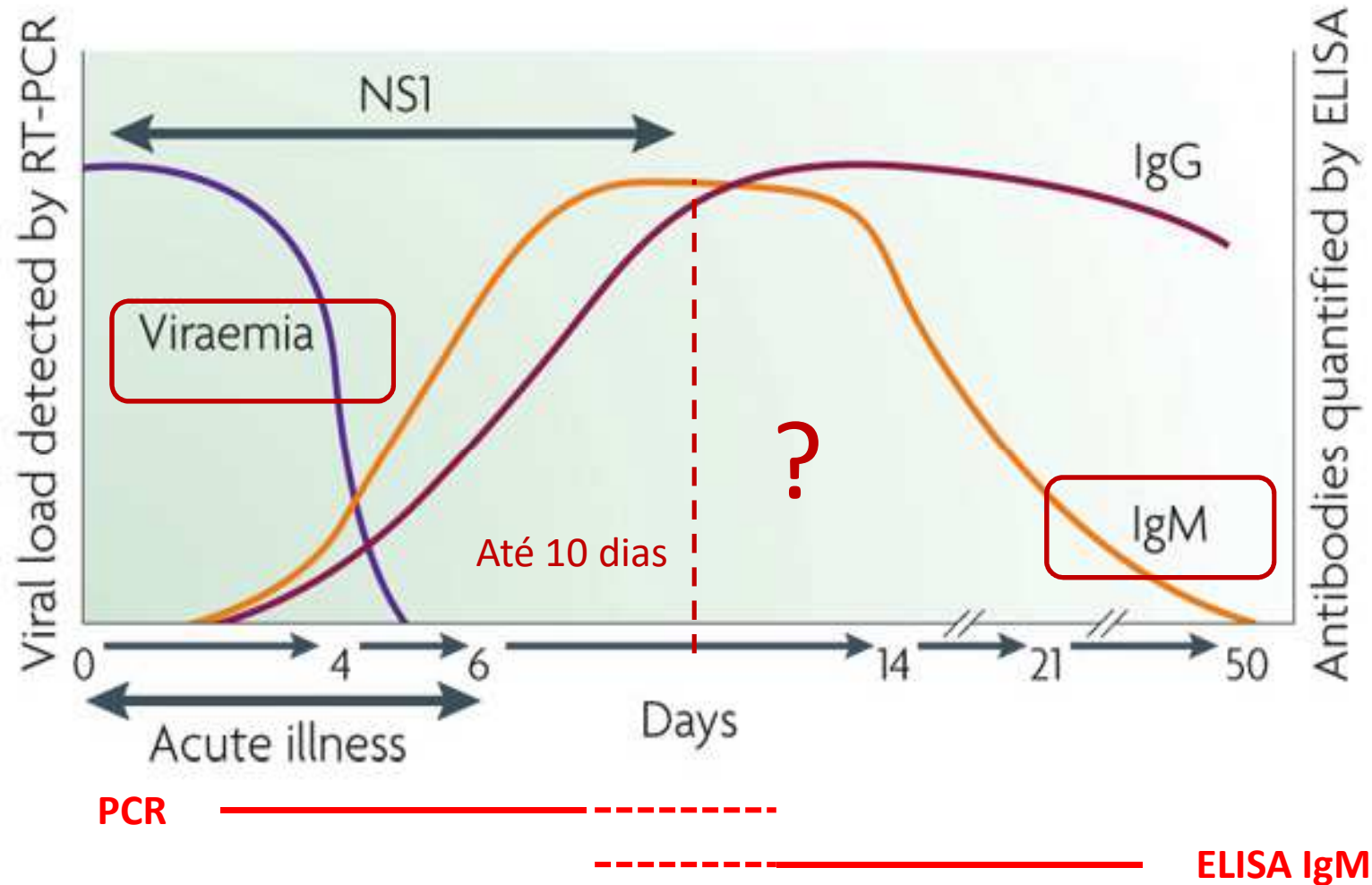
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FEBRE AMARELA

Exames realizados no Lacen-PR

METODOLOGIA			LAUDO
PCR Arboviroses	É um diagnóstico sintrômico "in house"	DenV (1,2,3 e 4)	10 dias
		ChikV	
		ZikV	
		FA (implementado em 2019)	
Sorologia	Deve ser pedido separadamente para cada agravo	IgM Dengue	7 a 15 dias
		IgM e IgG Chik	
		IgM e IgG Zik	
		IgM FA (implementado em 2019)	

Os critérios para solicitação seguem a história natural da doença

História natural da doença

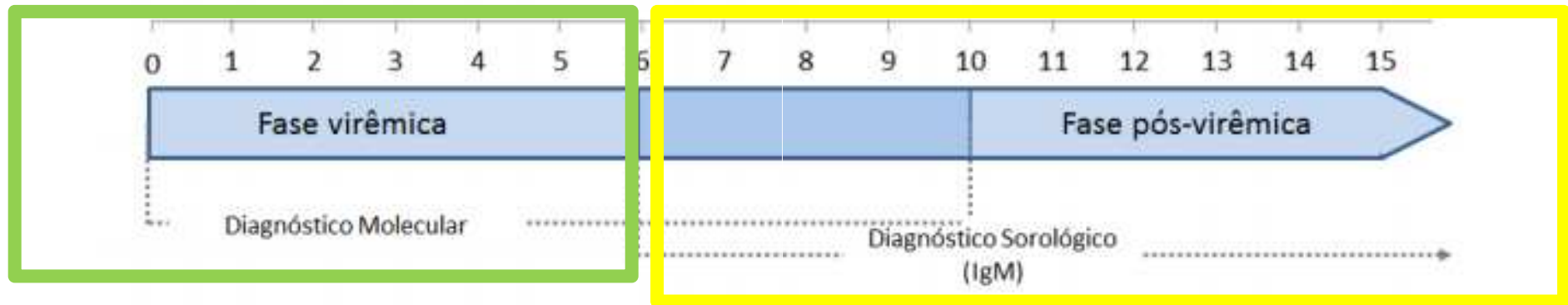


DIAGNÓSTICO PRELIMINAR É BASEADO:

- NA CLÍNICA DO PACIENTE,
- STATUS DA VACINAÇÃO
- HISTÓRICO DE VIAGENS,
- ÉPOCA DO ANO
- ATIVIDADES

Quais testes devem ser solicitados?

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



1 a 6 dias com sintomas:
fase AGUDA da doença:

detecção do vírus

- **ARBOVIROSES (BIOLOGIA MOLECULAR)**

Pesquisa DenV (1, 2, 3, 4)

+ ChikV

+ ZikV

+ **FAV**

A partir do 6º dia com sintomas:

- **FA IgM (SOROLOGIA)**



Onde encontro orientações sobre amostras?

The image shows a screenshot of the LACEN website. At the top, the URL is www.lacen.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=74. The page features the logo of the SECRETARIA DA SAÚDE and the LACEN logo (Laboratório Central do Estado do Paraná). A navigation menu on the left includes links like 'Página Inicial', 'LACEN Paraná', 'Divulgação', 'GAL', 'Rede Estadual de Laboratórios', 'Notas Técnicas', 'Manuais', 'Legislação', 'Fale Conosco', and 'Acesso Restrito'. The 'Manuais' section is highlighted with a red circle and contains the following links: [Manual de Coleta e envio de Amostras de Vigilância Ambiental](#), [Manual de Coleta e Envio de Amostras Biológicas](#), and [Manual de Coleta e Envio de Amostras de Vigilância Sanitária](#). Below this, a 'Leitura Complementar' section lists various technical manuals and guidelines. A sidebar on the left contains a search bar and a list of categories, with 'Saúde do Trabalhador' and 'Laboratório Central do Estado' circled in red.

SECRETARIA DA SAÚDE

LACEN Laboratório Central do Estado do Paraná

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ INSTITUTO DE SAÚDE DO PARANÁ

Manuais

Manuais:

- [Manual de Coleta e envio de Amostras de Vigilância Ambiental](#)
- [Manual de Coleta e Envio de Amostras Biológicas](#)
- [Manual de Coleta e Envio de Amostras de Vigilância Sanitária](#)

Leitura Complementar:

- Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV - 3ª edição
- Manual Nacional de Vigilância laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias
- Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica do Botulismo
- Guia para Orientação de Coleta de Escarro
- Cartilha de Proteção Respiratória Contra Agentes Biológicos para Trabalhadores de Saúde
- Exigências para Embalagem da Substâncias da Categoria B
- Portaria 29 do MS - HIV
- Manual de Coleta de Amostras de Sangue para Cargas Virais de HIV e Hepatites
- Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar

SECRETARIA DA SAÚDE

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ

MANUAL DE COLETA E ENVIO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS AO LACEN/PR

MANUAL 1.30.001

REVISÃO 08

LACEN

Mais de um século de história...

O QUE DIZ O MANUAL DE COLETA:

Manual de Coleta e Envio de Amostras Biológicas ao Lacen/PR

35. FEBRE AMARELA HUMANA

Solicitação no GAL: Deve ser feita de acordo com o período da doença:

Arbovírus – Biologia Molecular - **PLASMA (genoma viral)**

Febre Amarela – Sorologia - **SORO (IgM)**

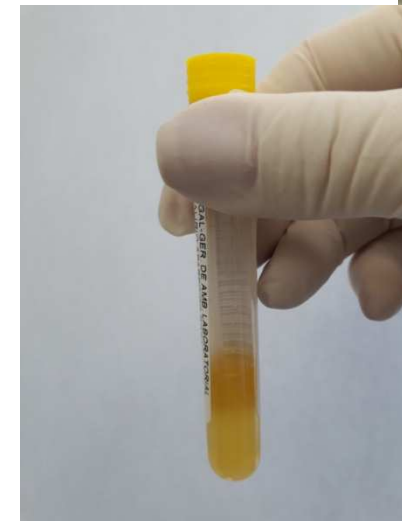
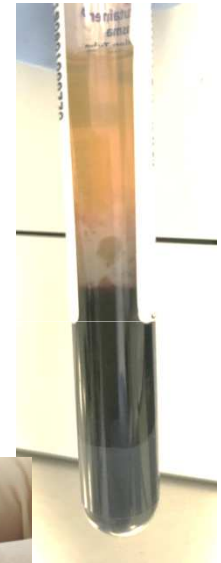
Febre Amarela – Anatomopatológico

FRAGMENTO DE TECIDO (recomenda-se fígado, baço, pulmão e cérebro)

Para Isolamento Viral e RT-PCR: coletar 3 fragmentos de tecido de aproximadamente 0,5 cm de espessura x 2,0 cm de comprimento, em embalagem estéril e refrigerada.

Para Estudos Histopatológicos e Imunohistoquímicos: coletar fragmentos de tecido de 0,3 cm a 0,6 cm de espessura.

GERENCIAMENTO DE AMOSTRAS ENCAMINHA PARA FIOCRUZ



ARBOVIROSES (BIOLOGIA MOLECULAR)

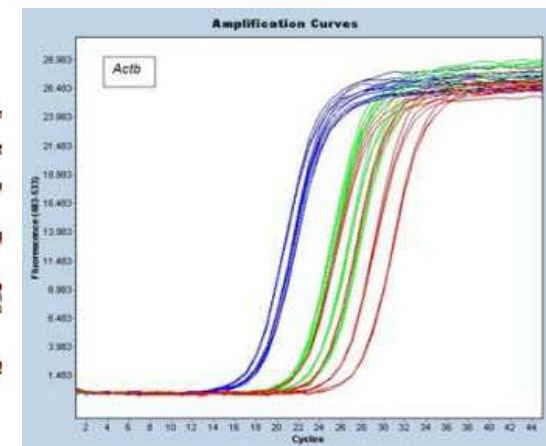
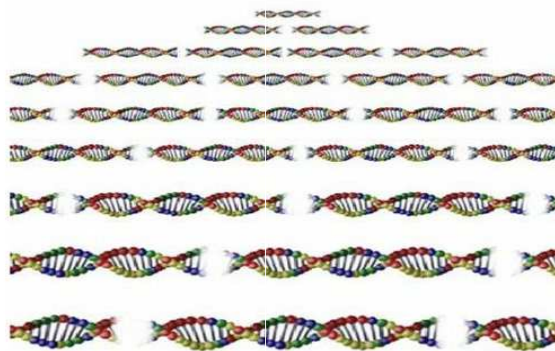
testes "in house" (segundo protocolos do MS)

Material:

a) Plasma - coletar sangue em tubo preparador de plasma (fornecido pelo Lacen/PR em conjunto com adaptador e agulha ou escalpe 23G ou 25G sob solicitação). Centrifugar em até 4 horas após a coleta a 1.100 x g durante 10 minutos.

Qual a finalidade do uso da PCR?

PCR - consiste em fazer cópias de DNA "in vitro", usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA.



Pesquisa de Arbovírus:

- DenV (1, 2, 3, 4)
 - +
 - ChikV
 - +
 - ZikV
 - +
 - **FAV**

Qual é a amostra que devemos coletar?

- Para exames de Biologia Molecular utilizar o tubo preparador de plasma, centrifugar e encaminhar no mesmo tubo para o Lacen/PR ou laboratório descentralizado correspondente, no caso de Carga Viral para HIV-1 e Hepatites Virais.
- Proceder conforme as orientações conforme figura 5:
 1. Gerar etiqueta do GAL com a identificação do paciente, com opção "por amostra";
 2. Colar a etiqueta no tubo com gel separador, sobre a etiqueta original.



Página 22 de 260

Figura 5 – Identificação do tubo com gel separador para Biologia Molecular

O QUE DIZ O MANUAL DE COLETA:

Material:

- a) Plasma - coletar sangue em tubo preparador de plasma (fornecido pelo Lacen/PR em conjunto com adaptador e agulha ou escalpe 23G ou 25G sob solicitação). Centrifugar em até 4 horas após a coleta a 1.100 x g durante 10 minutos.



V



Volume ↓↓↓

X



Excesso de etiquetas

X



Como devo armazenar a amostra até enviar ao Lacen/PR?

Acondicionamento e conservação da amostra:

a) Plasma: manter a amostra centrifugada no mesmo tubo preparador de plasma.

- Refrigerar entre 2 a 8 °C até o momento do envio. Enviar ao Lacen/PR em até 24 horas, preferencialmente no mesmo dia da coleta.

- Caso não seja possível obedecer este prazo, as amostras deverão ser congeladas a -20 °C. Esse procedimento deverá ser informado no campo observação do GAL: amostra congelada.

Importante: vale lembrar que ciclos de congelamento e descongelamento podem degradar o material genético e induzir a resultados falso negativos.

b) Soro para sorologia: Acondicionar em tubo de poliestireno com tampa de cor amarela, fornecido pelo Lacen/PR. Refrigerar entre 2 a 8 °C por até 72 horas, após este prazo, congelar a -20°C ou -70°C.

Como devo armazenar a amostra até enviar ao Lacen/PR?

c) Fragmentos de Tecidos para Isolamento Viral e RT-PCR: Os fragmentos de cada órgão *in natura* devem ser acondicionados separados em criotubo ou frasco estéril com tampa de rosca, devidamente lacrado e identificado com etiqueta do GAL e nome do fragmento. Congelar os fragmentos a -70°C , caso não tenha essa possibilidade, congelar a -20°C , enviar ao Lacen/PR em até 48 horas.

Importante: Não utilizar nenhum tipo de conservante para armazenamento dos fragmentos para Isolamento Viral e RT- PCR.

d) Fragmentos de Tecidos para Estudos Histopatológicos e Imunohistoquímicos: Os fragmentos de cada órgão devem ser acondicionados em Formalina a 10% Tamponada, em tubo ou frasco com tampa de rosca, devidamente lacrado e identificado com etiqueta do GAL e nome do fragmento. O volume de Formalina a 10% Tamponada deve ser 10 a 20 vezes maior que o volume dos fragmentos. Conservar os frascos à temperatura ambiente.

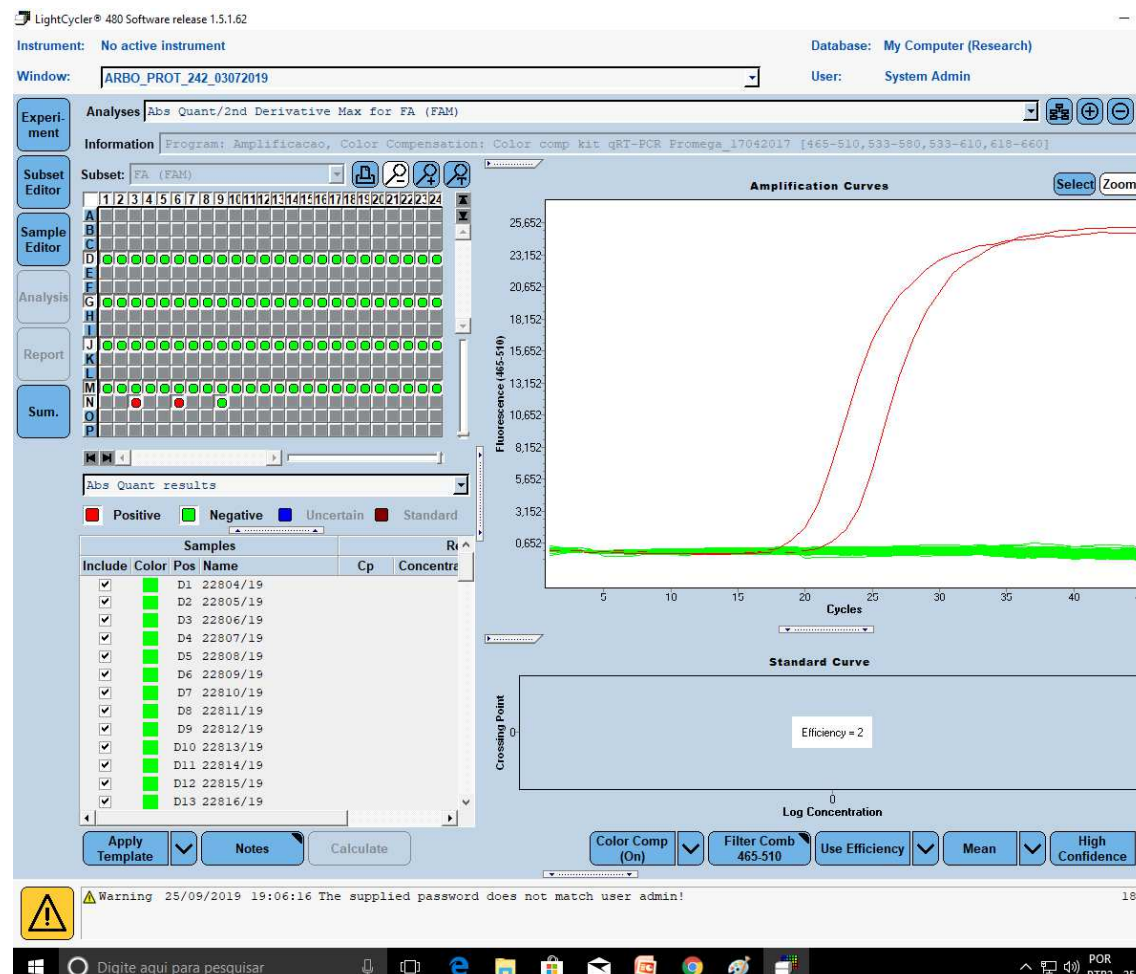
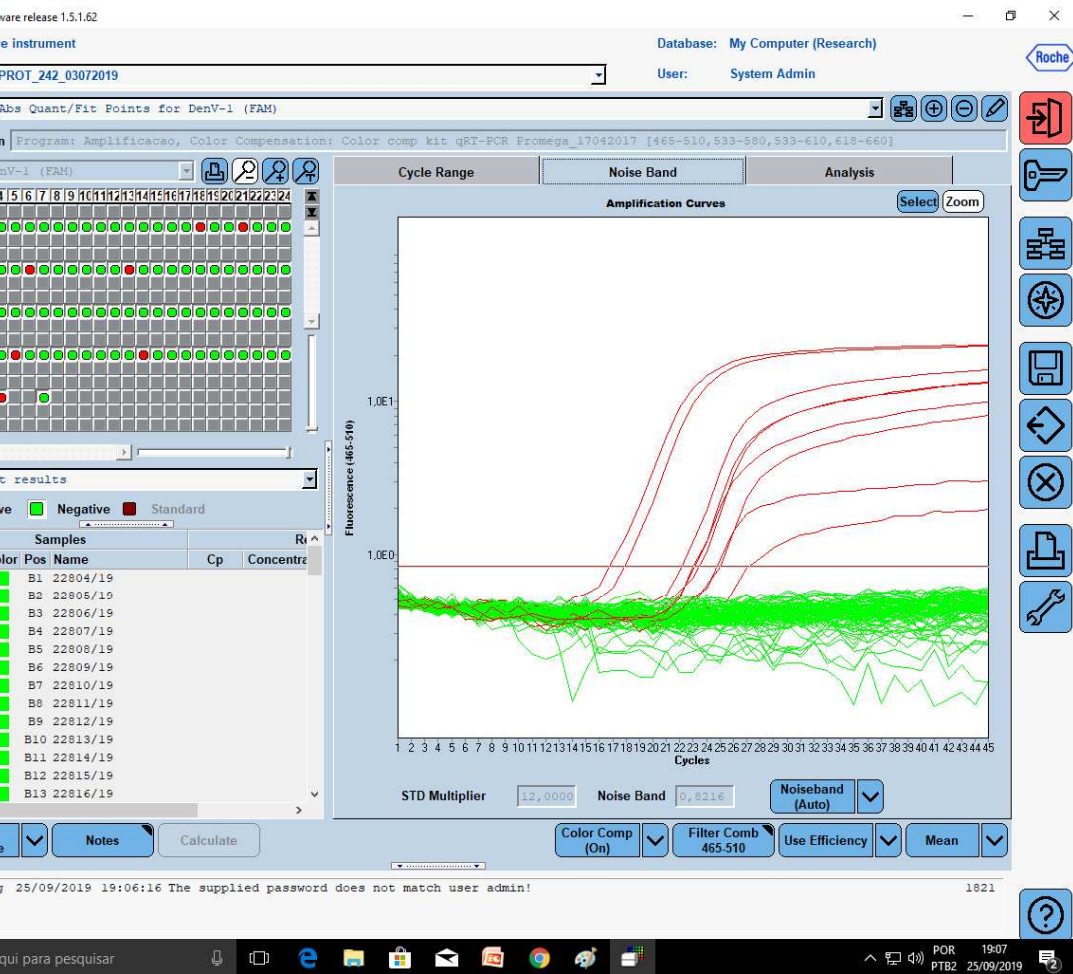
Importante: Nunca congelar.

Como devo acondicionar a amostra para transporte até o Lacen/PR?

Transporte:

- a) Material para Isolamento Viral e RT-PCR: em caixa de isopor com gelo seco (lacrar a tampa da caixa em cruz). Na impossibilidade de obtenção de gelo seco, enviar em caixa de isopor com bastante gelo reciclável.
- b) Soro: em caixa de isopor com gelo reciclável;
- c) Material para Estudos Histopatológicos e Imunohistoquímicos: em caixa de isopor à temperatura ambiente.

RESULTADOS PCR EM TEMPO REAL



Principais desafios para o diagnóstico molecular

amostras têm que ser coletada **em tubo especial (EDTA PPT)**, mantida sob refrigeração ou congelamento, sem ciclos de descongelamento;

o resgatar amostras de hemograma que estejam armazenadas de forma inadequada e direcionar para a PCR. Essas amostras podem gerar resultados falsos e não descartadas como impróprias.

Desafiar as Unidades para a identificação precoce dos casos suspeitos. No momento, a PCR é a melhor ferramenta diagnóstica disponível, mas seus resultados inicialmente são confiáveis durante a fase aguda da doença.

Principais desafios para o diagnóstico molecular

PCR realizada no momento **não é capaz de diferenciar cepa selvagem de cepa vacinal para FA**. TODOS OS CASOS POSITIVOS POR PCR SÃO ENCAMINHADOS PARA FIOCRUZ PARA DIFERENCIAÇÃO.

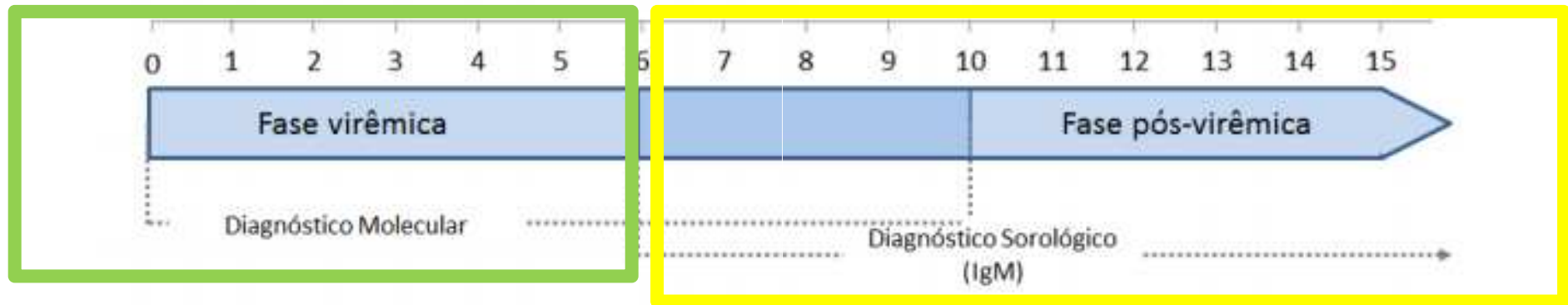
Em caso de EAPV, coletar EDTA PPT e líquido, se necessário. O plasma será processado no Lacen/PR e, se detectável, será laudado e a amostra será encaminhada para Fiocruz para identificação da cepa.

Outros materiais exceto plasma serão sempre encaminhados à Fiocruz.

O prazo para liberação de resultados é definido pela Fiocruz, de acordo com sua capacidade de processamento.

Quais testes devem ser solicitados?

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



1 a 6 dias com sintomas:
fase AGUDA da doença:

detecção do vírus

- **ARBOVIROSES (BIOLOGIA MOLECULAR)**

Pesquisa DenV (1, 2, 3, 4)

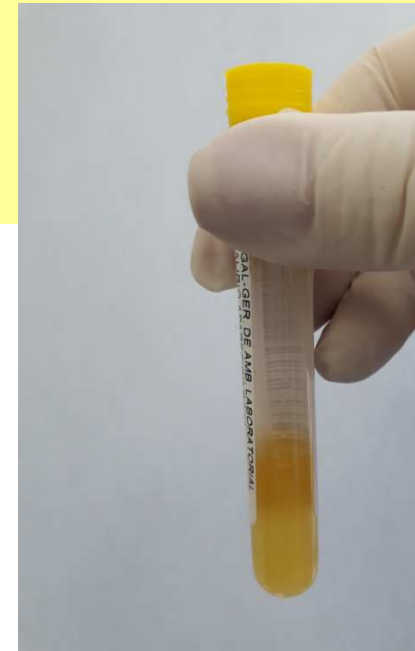
+ ChikV

+ ZikV

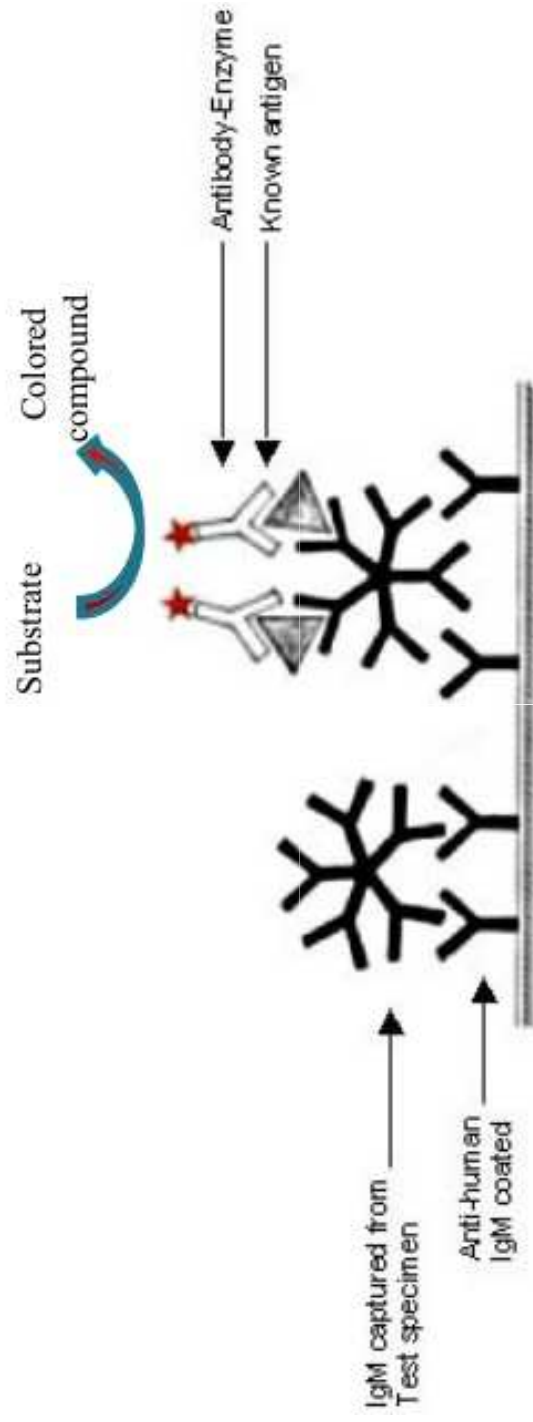
+ **FAV**

A partir do 6º dia com sintomas:

- **FA IgM (SOROLOGIA)**



IgM-capture (MAC) – ELISA



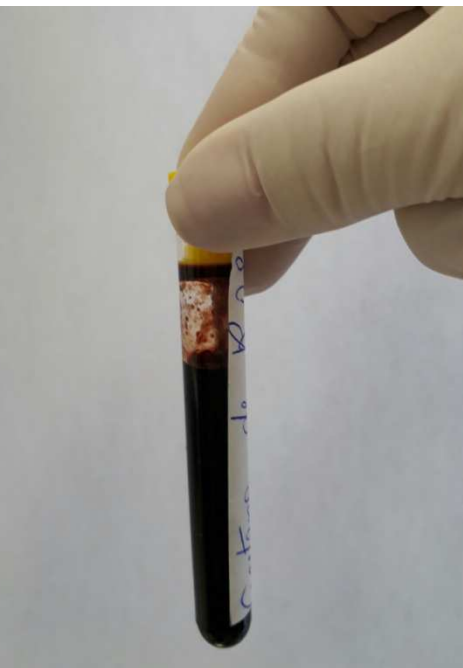
Qual é a amostra que devemos coletar?

- Para exames de Sorologia, após centrifugação do tubo mãe, verificar o aspecto da amostra. O soro deve estar livre de resíduos de hemácias. Se o soro estiver fortemente hemolisado ou lipêmico, providenciar nova coleta.
- Transferir o soro obtido para o tubo correspondente, previamente identificado, com auxílio de pipeta plástica tipo Pasteur descartável ou pipetador.
- Proceder conforme orientações da figura 4

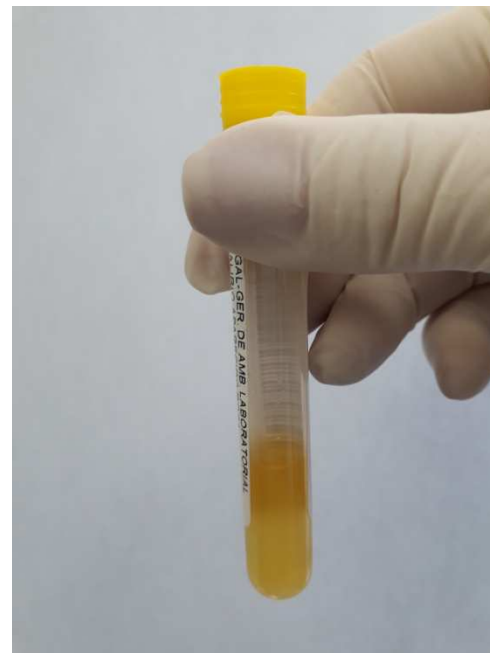


Figura 4 – Identificação do tubo de poliestireno para sorologia

Amostras inadequadas



Amostras adequadas



Principais desafios para o diagnóstico sorológico

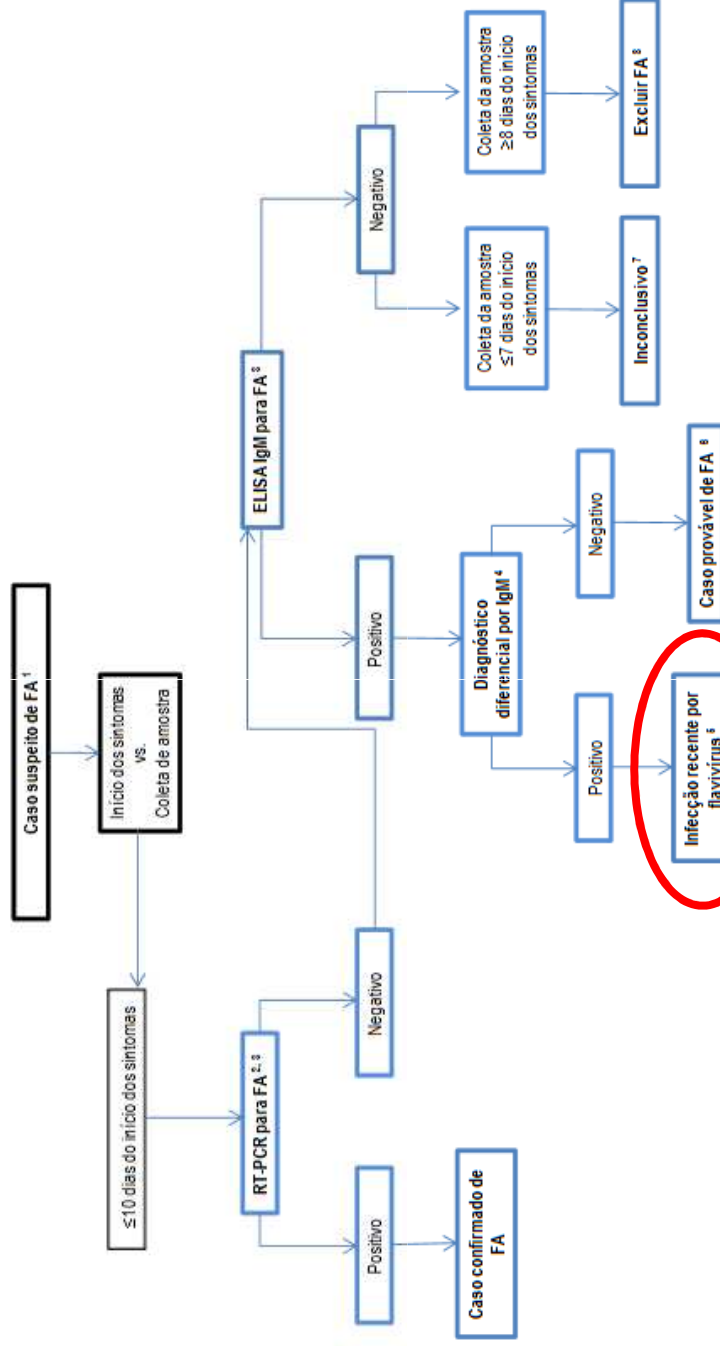
erentes arbovírus circulam simultaneamente no Brasil, causando sintomatologia semelhante e dificultando o diagnóstico clínico (DenV, ZikV e FAV);

orre reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos para combater infecções por *Flavivirus* dando a reações falso-positivas e dificultando a interpretação dos testes sorológicos.

da não temos disponível um antígeno que seja 100% específico para cada Flavivírus. Assim, em situações de co-circulação, a atitude mais prudente seria interpretar os resultados sorológicos reage o “Reagente para Flavivírus”.

este “*in house*”, trabalhoso e demorado.

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 descrita, 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 referência. Este resultado não descartar 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.

Cuidados que devemos ter com o cadastro no GAL:

- Verificar se o exame foi cadastrado no GAL para a amostra de plasma; e se a etiqueta “por amostra” equivale à amostra de plasma e não a outra que tenha sido coletada na mesma data.
- Informar CORRETAMENTE a data de início dos sintomas.
- Informar nas Observações os principais sintomas e outros dados epidemiológicos relevantes (Viajou? Para onde? Há quanto tempo? Tomou vacina para FA? Quando?)
- Evitar cadastrar sucessivamente o mesmo paciente.

Pergunte-se:

- Estou solicitando o exame correto de acordo com os dias com sintomas?
- A amostra que estou coletando é adequada para a realização do exame solicitado?

O LACEN NÃO REVERTERÁ AMOSTRAS DA BIOLOGIA MOLECULAR (PLASMA) PARA A SOROLOGIA (SORO), E VICE-VERSA.

Informação importante:

A equipe do Lacen/PR somente atende em regime de plantão os casos de meningite bacteriana.

Outros agravos (febre amarela, dengue, leptospirose etc), ainda que sejam casos graves, não há previsão para serem processados no plantão.

Então, nessas situações, coletar as amostras conforme recomendação do Manual de Coleta, armazenar de forma adequada no laboratório da Unidade responsável e encaminhar ao Lacen/PR no próximo dia útil.

Tem outras dúvidas?

- Consulte o Manual de Coleta do Lacen/PR, revisão 8.
- Não encontrou a resposta para a sua dúvida no Manual de Coleta? Entre em contato conosco ANTES de coletar ou enviar as amostras:
- Mayra M. Presibella – Biologia Molecular
mayrapresibella@sesa.pr.gov.br
- Maria do Carmo Debur – Biologia Molecular
mariadebur@sesa.pr.gov.br
(41) 3299-3272
- Carla Bortoleto - Sorologia
carlabortoleto@sesa.pr.gov.br
(41) 3299-3296

OBRIGADA PELA ATENÇÃO!