



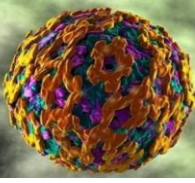
Papel dos laboratórios de saúde pública durante surtos de febre amarela: Experiência do Brasil 2016-2017

Ana Maria Bispo de Filippis

LABFLA, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

SEMINÁRIO – OFICINA CONJUNTA UNASUR / CPLP DE ATUALIZAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA SOBRE FEBRE AMARELA E OUTRAS ARBOVIROSES EMERGENTES E REEMERGENTES
Rio de Janeiro, 2-6 de Novembro, 2017

Vírus Febre amarela



Arbovírus

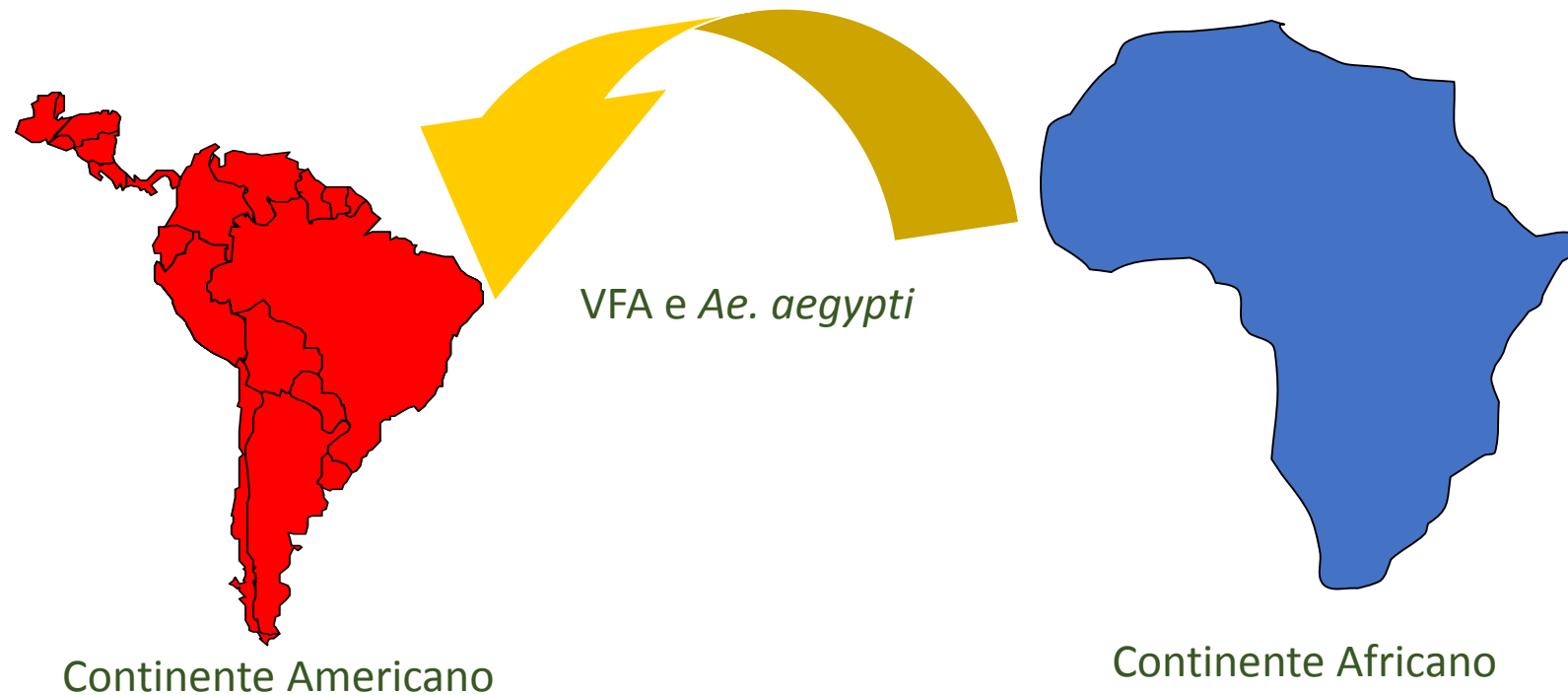
- ✓ grupo ecológico de vírus RNA transmitidos por vetores **artropódes** hematófagos
- ✓ Membro protótipo da família *Flaviviridae* - nome do latim “flavus” → “amarelo”
- ✓ Gênero *Flavivirus* — mesmo grupo do dengue, zika, oeste do nilo
- ✓ Sorotipo único
- ✓ 2 genótipos nas Américas (I e II) e 5 genótipos na África
- ✓ Principais reservatórios amplificadores: Primatas não humanos



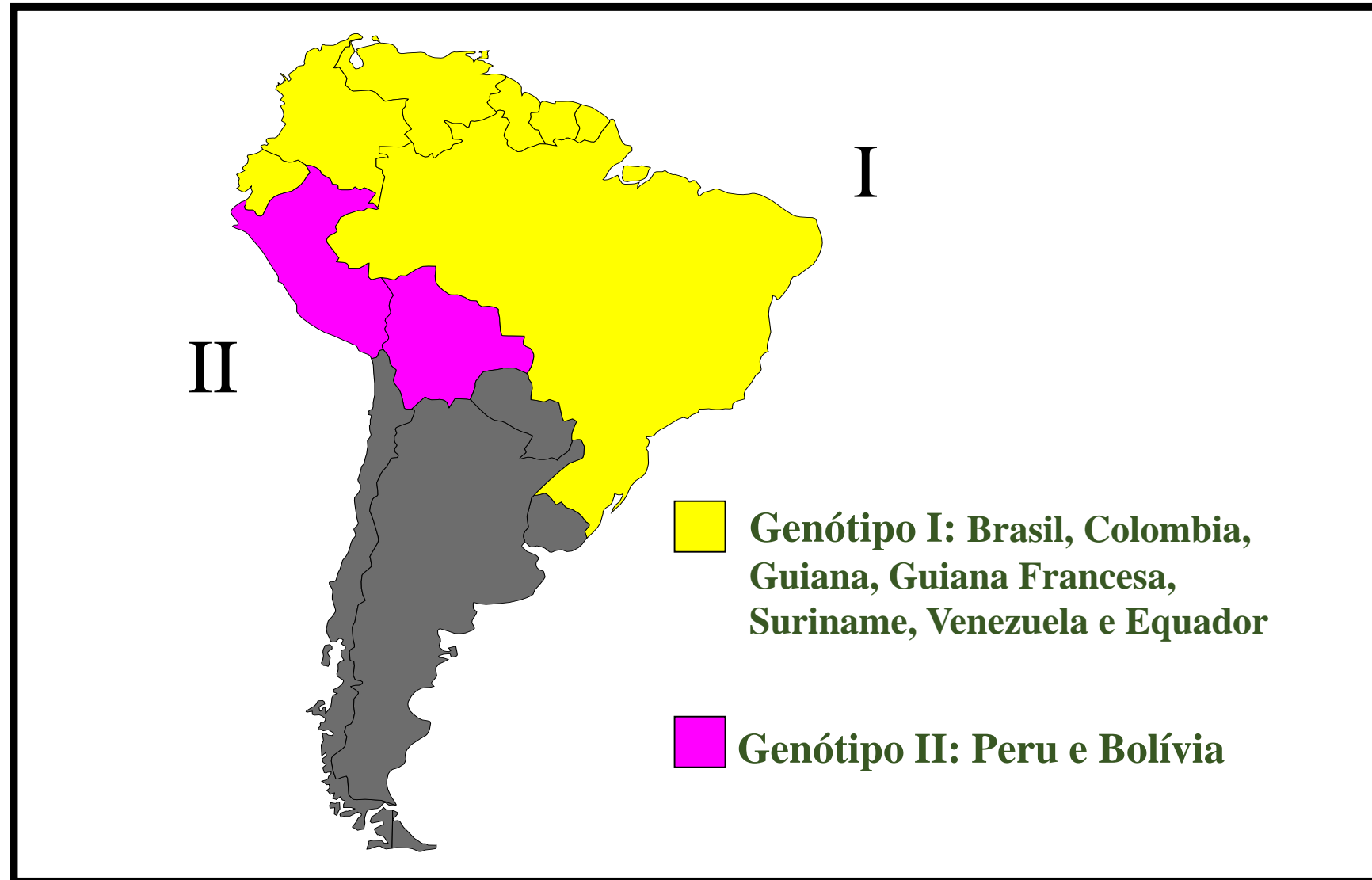
Vírus Febre amarela

Introdução no Novo Mundo

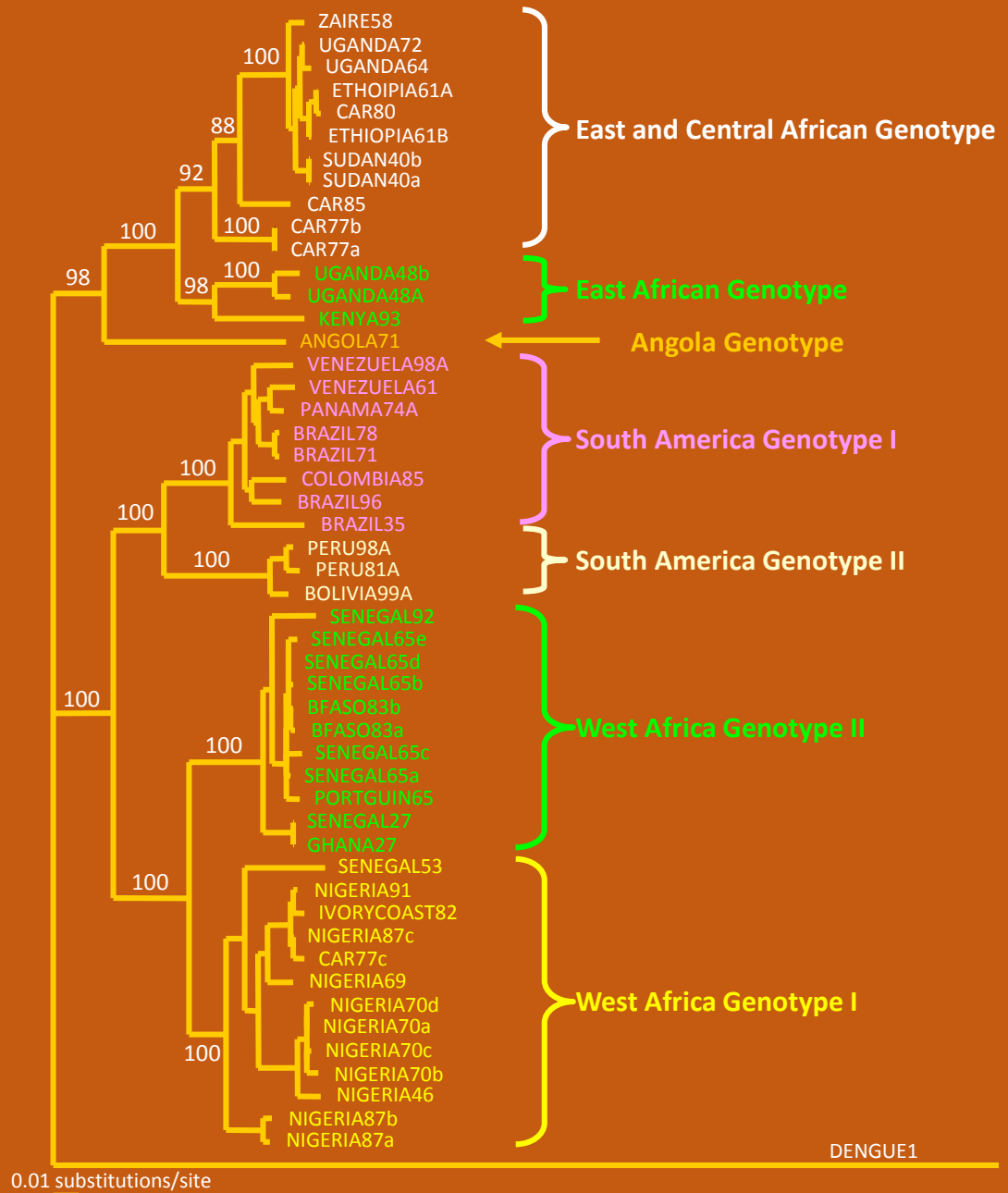
Paradigma: durante o tráfico de escravos assim como o seu vetor urbano, o *Aedes aegypti*



Vírus Febre amarela



Neighbor-Joining Tree For Wild Strains of YF Virus Using Nucleotide Sequence of the prM/E region (Mutebi *et al.* 2001)



GENÓTIPOS VFA África

Classificação segundo Mutebi et al, 2001

prM/E region

- Angola
- East / Central Africa
- East Africa
- West Africa Genotype II
- West Africa Genotype I

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FEBRE AMARELA

Ferramenta fundamental para a vigilância



Evitar o risco de re-urbanização da doença
Impedir a implantação de epidemias

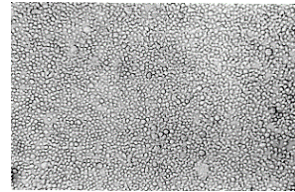


DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
(Dengue, Leptospirose, Malária, Hepatite,...)

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

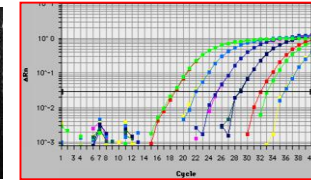
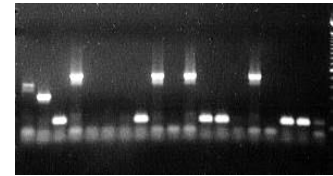
Isolamento viral

- ✓ *Cultura de células*
- ✓ *Inoculação intratorácica mosquitos*
- ✓ *Inoculação em cérebro de camundongo*



Deteção de ácidos nucleicos virais

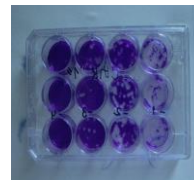
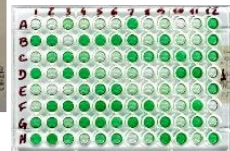
- ✓ *RT-PCR, RT-PCR em tempo real*



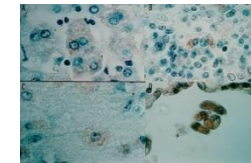
Deteção de anticorpos IgM, IgG

Testes "in house"

- ✓ *Mac-ELISA – IgM*
- ✓ *G-Elisa- IgG*
- ✓ *PRNT*
- ✓ *IF*



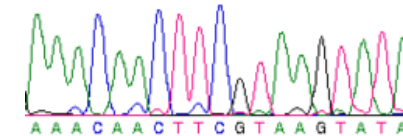
- ✓ *Histopatológico e Imunohistoquímica*



Deteção de antígeno viral

- ✓ *IFA*

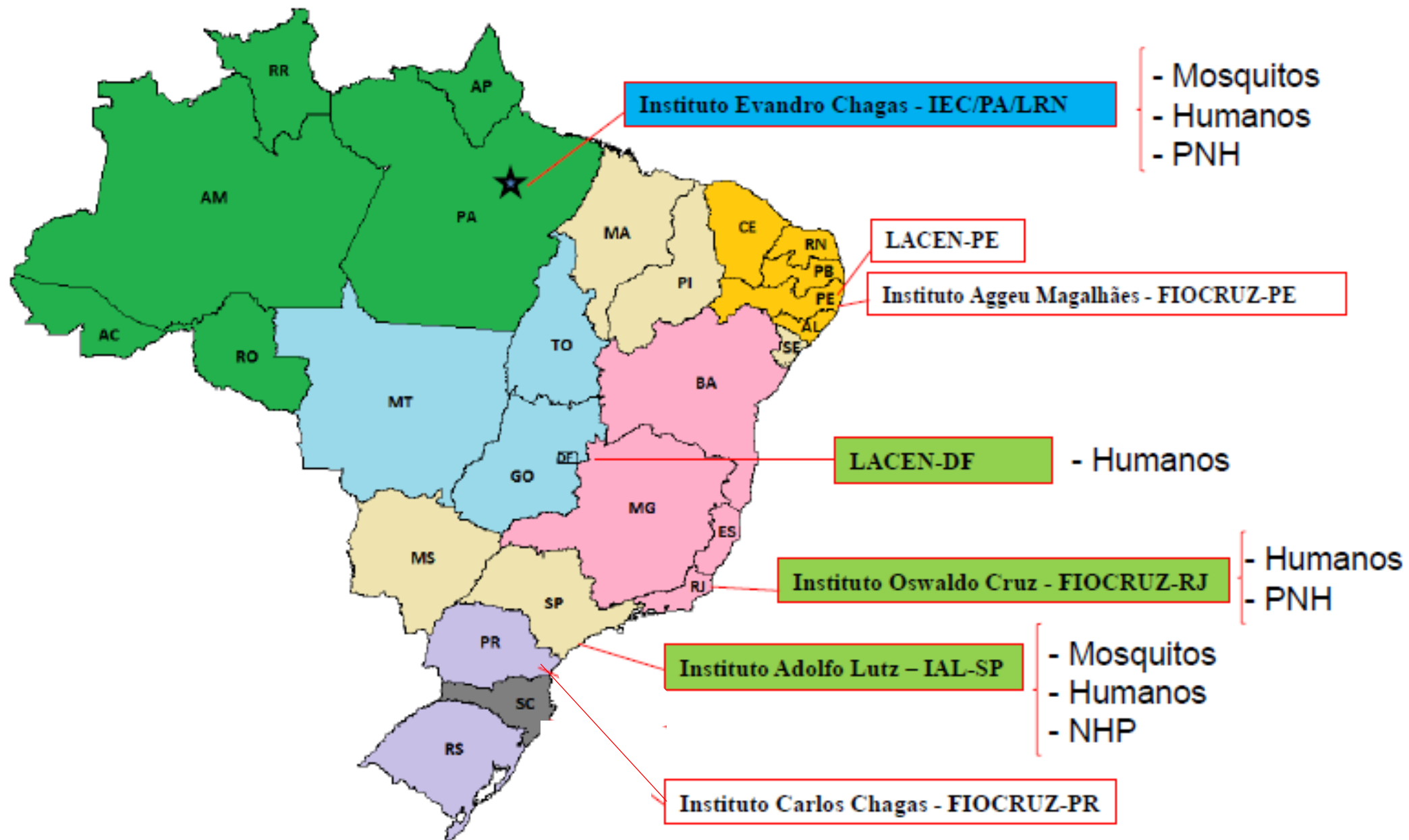
- ✓ *Sequenciamento do genoma (parcial ou completo)*



Confirmação Laboratorial de Infecção por VFA

- ✓ Detecção de RNA ou isolamento viral (definitivo);
- ✓ Detecção de IgM (presumtivo);
- ✓ Aumento de ≥ 4 vezes título de anticorpos entre a amostra aguda e a convalescente;
- ✓ Detecção de antígeno viral

REDE DE LABORATÓRIOS DIAGNÓSTICO FEBRE AMARELA



REDE DE LABORATÓRIOS DIAGNÓSTICO FEBRE AMARELA

Laboratório de Referência Nacional

Instituto Evandro Chagas (IEC-PA): Mac-Elisa; RT-PCR; Isolamento Viral e Sequenciamento
AC, AM, RO, RR, PA, AP, TO, AL, PI e PE

03- Laboratórios de Referência Regional

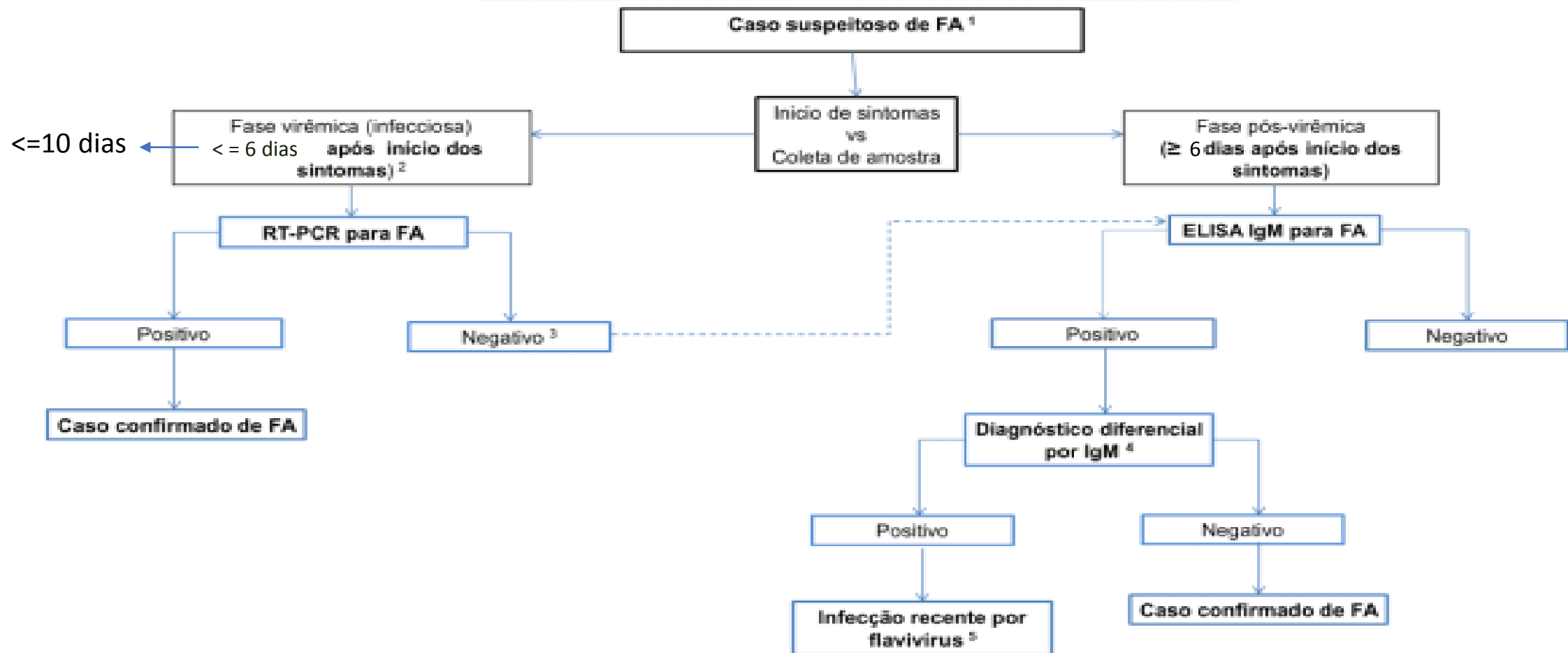
Fiocruz/RJ*: Mac-Elisa; RT-PCR; Isolamento Viral e Sequenciamento
RJ, ES, BA, RN, CE, MG

LACEN/DF: Mac-Elisa e RT-PCR
DF, GO, MT, MS e PB

IAL/SP: Mac-Elisa; RT-PCR; Histopatológico e Imunohistoquímica
SP, PR, SC, RS, SE e MA

01 Laboratório Emergencial

Algoritmo para confirmação de Febre Amarela



¹ Caso suspeito não vacinado (ou antecedente de vacinação não conhecido)

² Em alguns casos, o RNA viral pode ser detectado até 7 dias após o início dos sintomas

³ Se a PCR é negativa, verificar as condições de coleta, transporte e qualidade da amostra. Também considerar a coleta de uma amostra da fase pós-virêmica para fazer diagnóstico sorológico

⁴ Deve incluir pelo menos dengue e de acordo com a situação epidemiológica da região/país, outros flavivirus

⁵ Se existem amostras disponíveis, considerar PRNT com amostras pareadas em um laboratório de referência

Diagnóstico Molecular

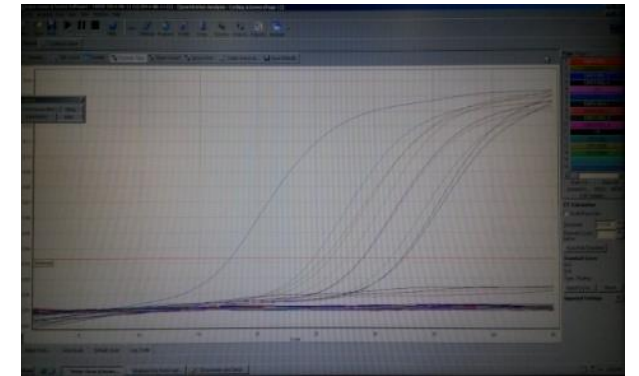
rRT-PCR protocolo “in house”



Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories

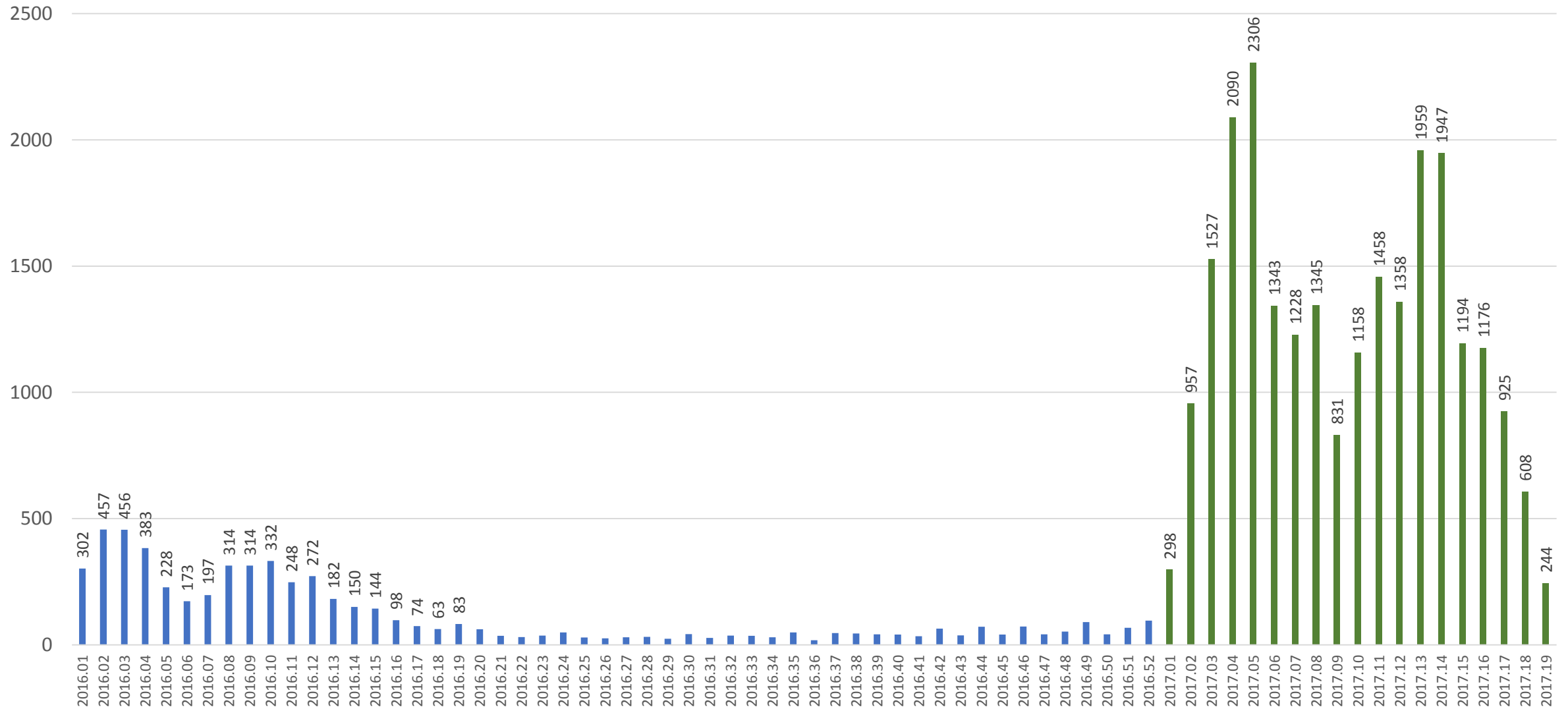
Cristina Domingo,^a Pranav Patel,^a Jasmin Yillah,^a Manfred Weidmann,^b Jairo A. Méndez,^c Emmanuel Rivalyn Nakouné,^d and Matthias Niedrig^a

Robert Koch Institute, Berlin, Germany^a; University Medical Center, Department of Virology, Göttingen, Germany^b; Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Virología, Bogotá, Colombia^c; and Institute Pasteur de Bangui, Bangui, Central African Republic^d

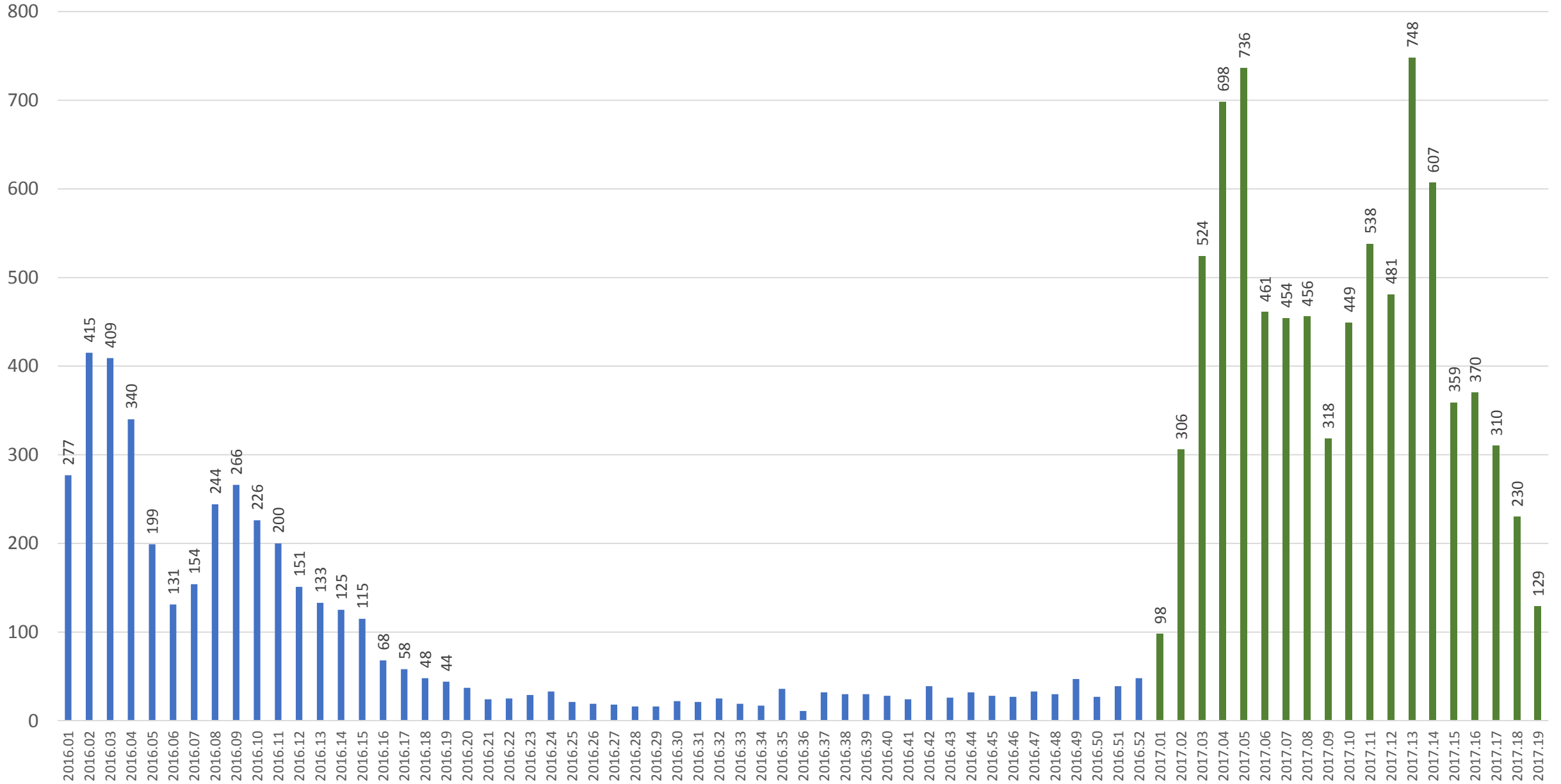


Protocolo CDC (Primers e sonda – Barbara Jonhson/CDC)

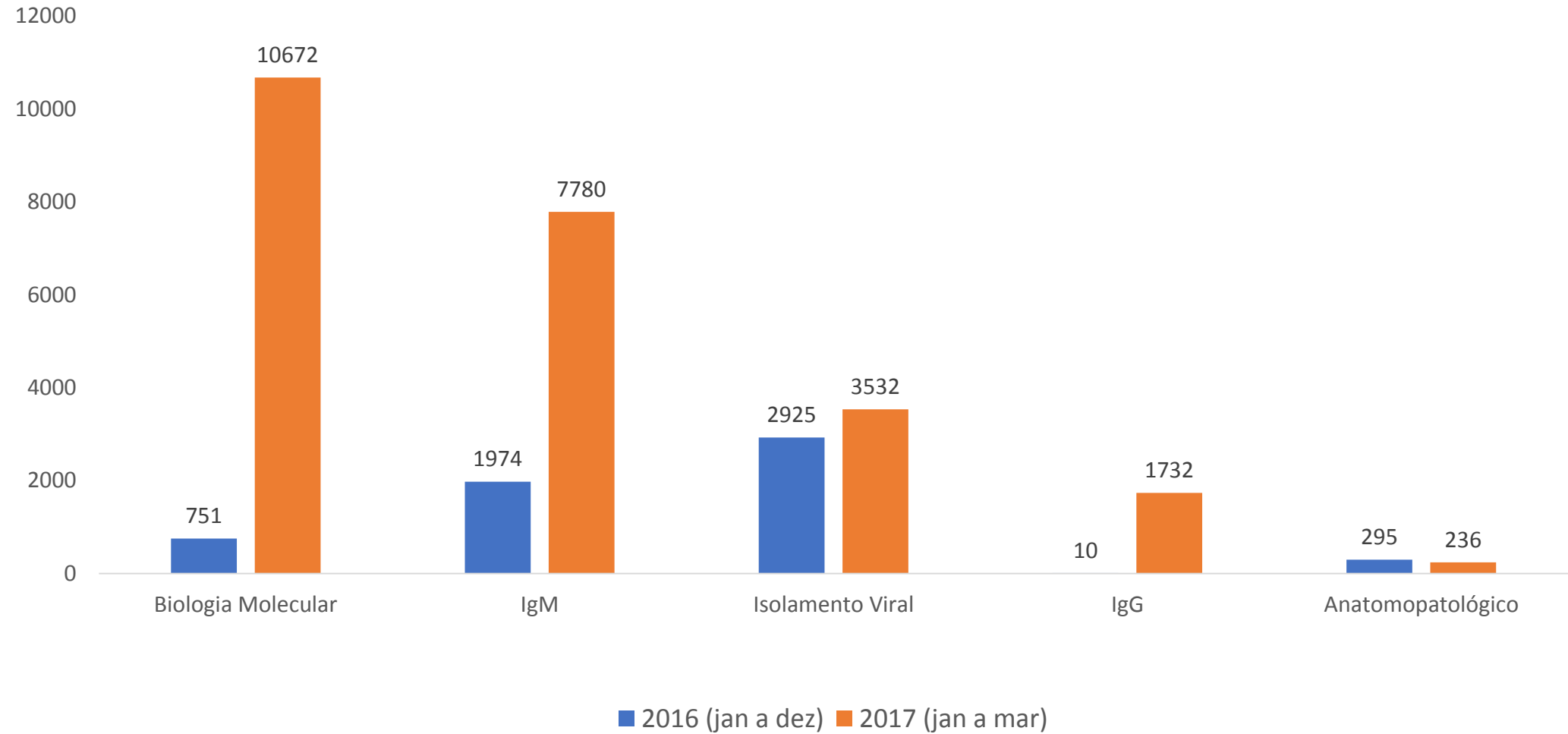
Número de exames de febre amarela solicitados de casos humanos por semana epidemiológica. Brasil, 2016 a 2017



Casos suspeitos febre amarela com solicitação de exames por semana epidemiológica Brasil, 2016 a 2017



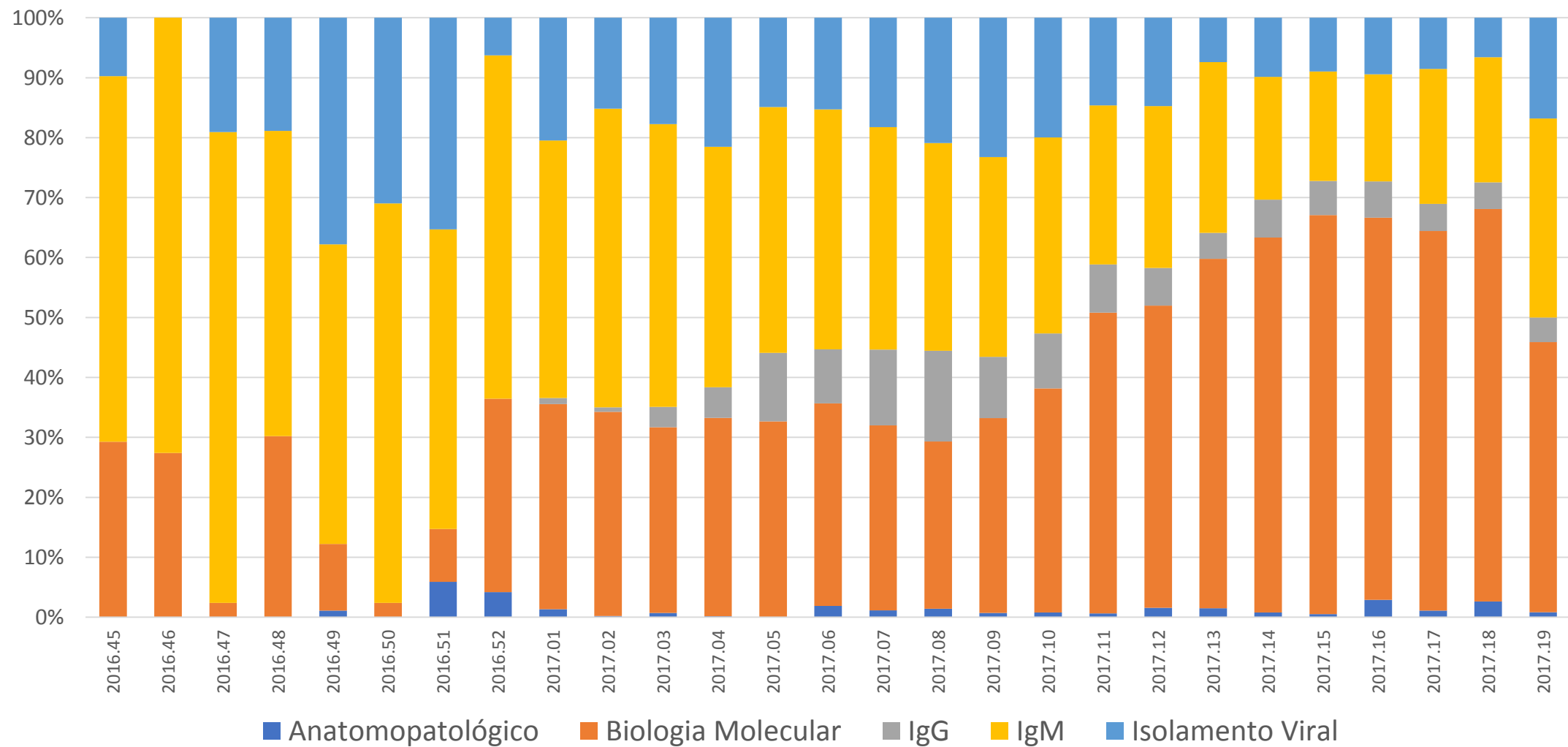
Quantitativo de exames febre amarela em amostras de casos humanos por metodologia e ano, Brasil 2016 e 2017.



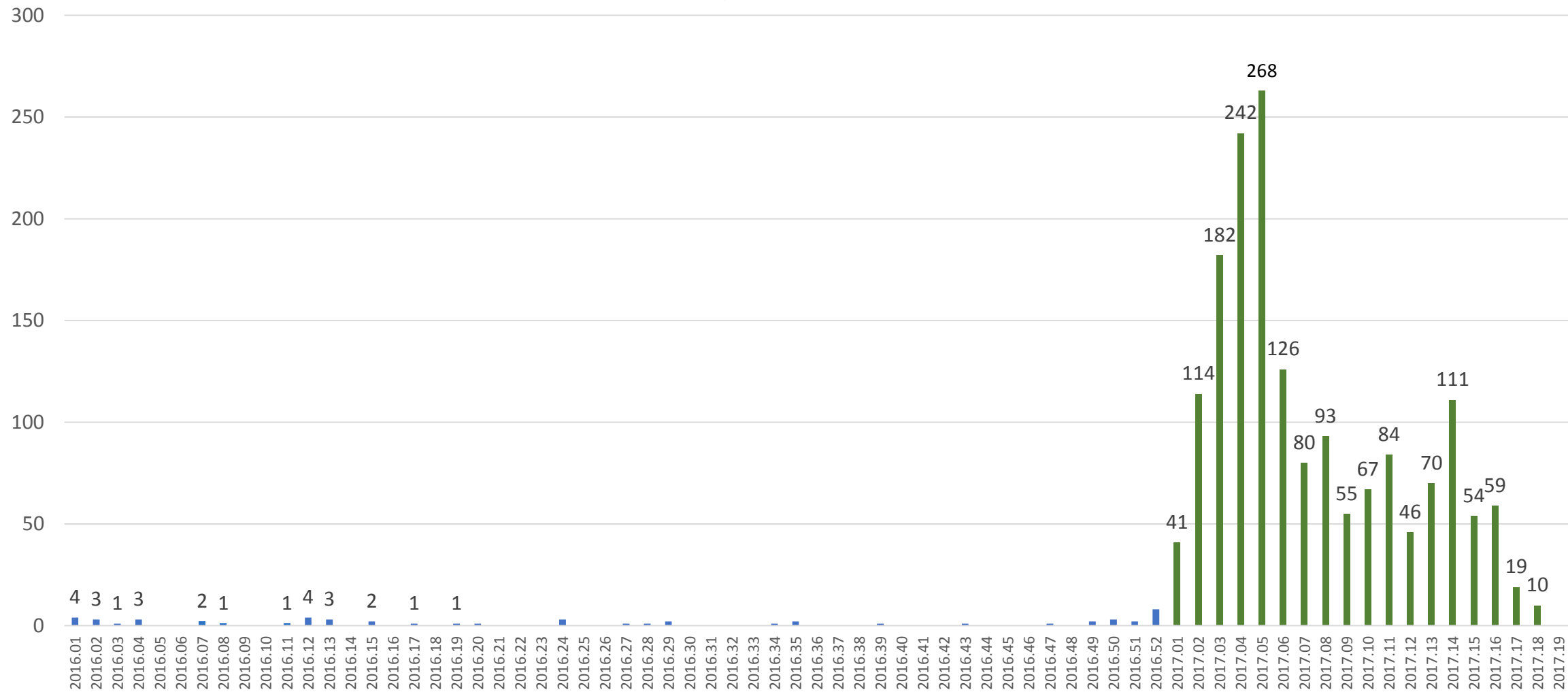
Fonte: GAL

Atualização: 12.05.2017

Distribuição de percentual de exames de febre amarela em humanos por metodologia e semana epidemiológica Brasil, Nov/2016 a Maio/2017.

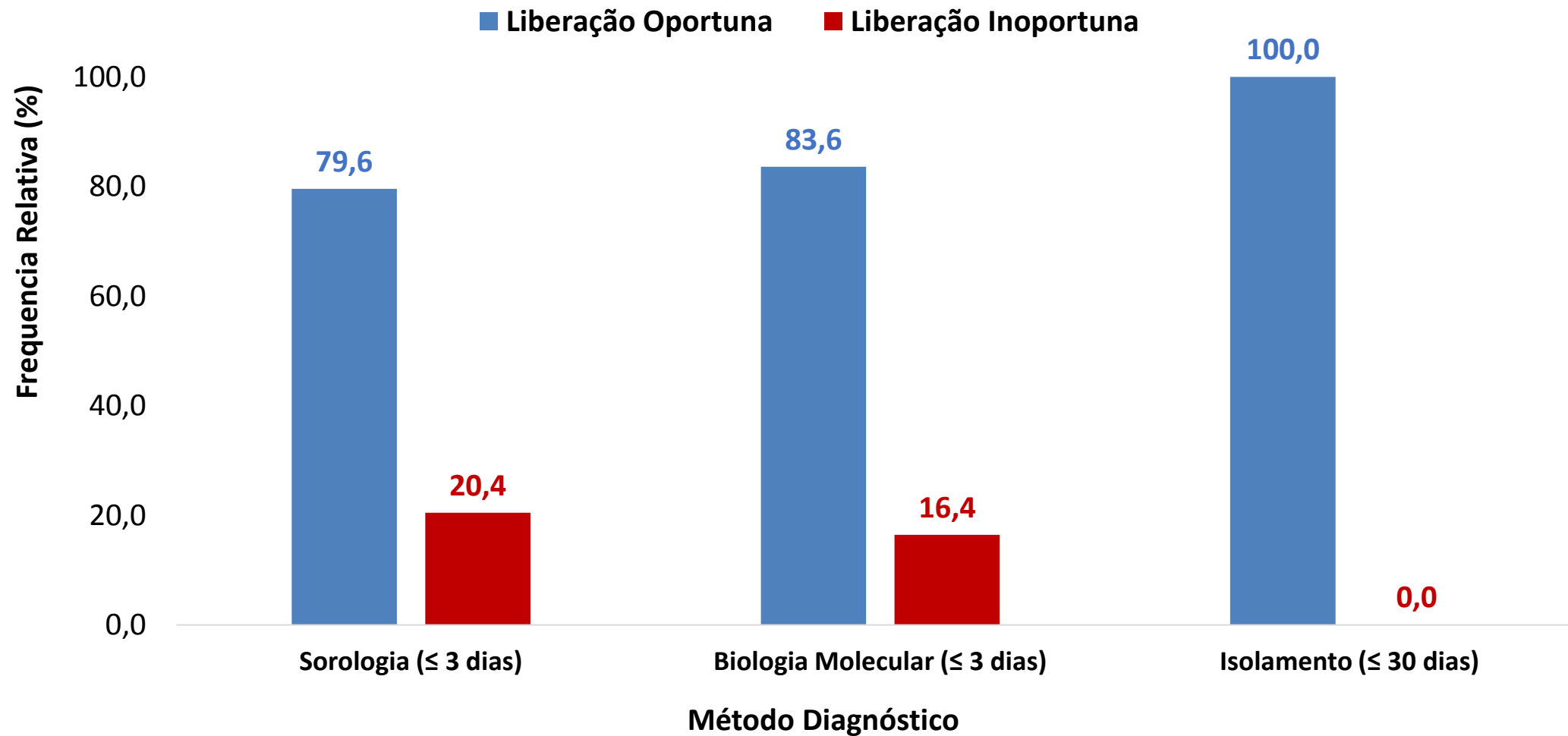


Número de pacientes com pelo menos um resultado positivo para febre amarela por semana epidemiológica. Brasil, 2016 a 2017

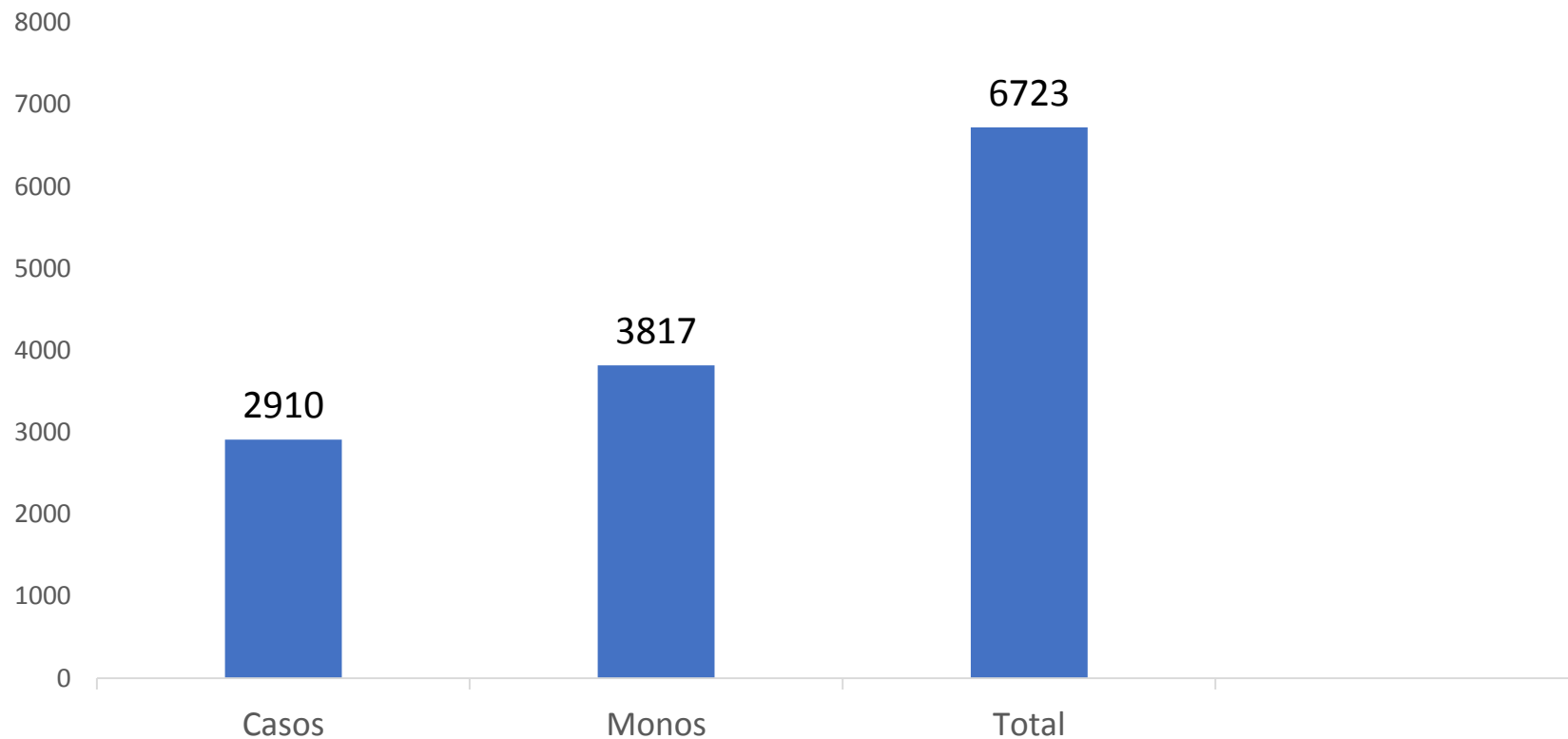


Atualização: 12.05.2017

Oportunidade de liberação de resultados de amostras pelo laboratório executor do diagnóstico



Amostras diagnóstico febre amarela recebidas Fiocruz, Jan-Mai 2017



Tipos de amostras: soro, sangue, tecidos, (cerebro, rins, baço, fígado, coração, pulmão) LCR e urina

Resultados de Laboratório

- ✓ Media de dias liberação de resultados RT-PCR amostras tecido: PNH – 5 dias (48 hs – 12 dias)
casos – 3 dias (24 hs – 4 dias)
- ✓ Amostras de fluidos corporais por RT-qPCR - 48 hs (6hs – 72hs)
- ✓ Amostras sorologia – 48 hs (72 hs – 5 dias)
- ✓ Cts RT-PCRs de amostras casos – 20 a 34
amostras PNH Allouata - 4 a 20
Callitrix - 27 a 37
Casos de EAPV – Cts 27 a 38

EID journal

October 2017

Manuscript Submission

About the Journal



Subscribe

Ahead of Print / In Press



Lineage-Specific Real-Time
RT-PCR for Yellow Fever
Virus Outbreak
Surveillance, Brazil

[CDC](#) > [EID journal](#) > [Ahead of Print / In Press](#)



Volume 23, Number 11—November 2017

Dispatch

Lineage-Specific Real-Time RT-PCR for Yellow Fever Virus Outbreak Surveillance, Brazil

Carlo Fischer¹, Maria C. Torres¹, Pranav Patel, Andres Moreira-Soto, Ernest A. Gould, Rémi N. Charrel, Xavier de Lamballerie, Rita Maria Ribeiro Nogueira, Patricia C Sequeira, Cintia D S Rodrigues, Beate M. Kümmerer, Christian Drosten, Olfert Landt, Ana Maria Bispo de Filippis✉, and Jan Felix Drexler✉

On This Page

[The Study](#)

Yellow Fever in Brazil: From the endemic to epidemic 2016-2017 *Nature*
Yellow Fever in the Southeast of Brazil: Molecular Epidemiology *Eurosurveillance*

Resultados parciais amostras casos humanos testados por RT-PCR and Mac-Elisa Jan-May/2017

SAMPLE	RT-PCR (794)			SEROLOGY IgM (496)			
	Total	Pos (%)	Neg	Total	Pos	Neg	Incon*
Serum	668	210 (31,4%)	458	485	172 (35,4%)	298	15
Blood	39	18 (46%)	21	5	1 (20%)	4	
Plasma	1	0	1	2	0	2	
CSF	22	2 (9%)	20	4	2 (50%)	2	
Urine	7	2 (28,5%)	5				
Liver	24	21 (87,5%)	3				
Spleen	4	3 (75%)	1				
Heart	3	3 (100%)	0				
Lung	3	3 (100%)	0				
Kidney	21	19 (90,4%)	2				
TOTAL	792	281	511	496	175	306	15

*Inconclusive result in IgM detection

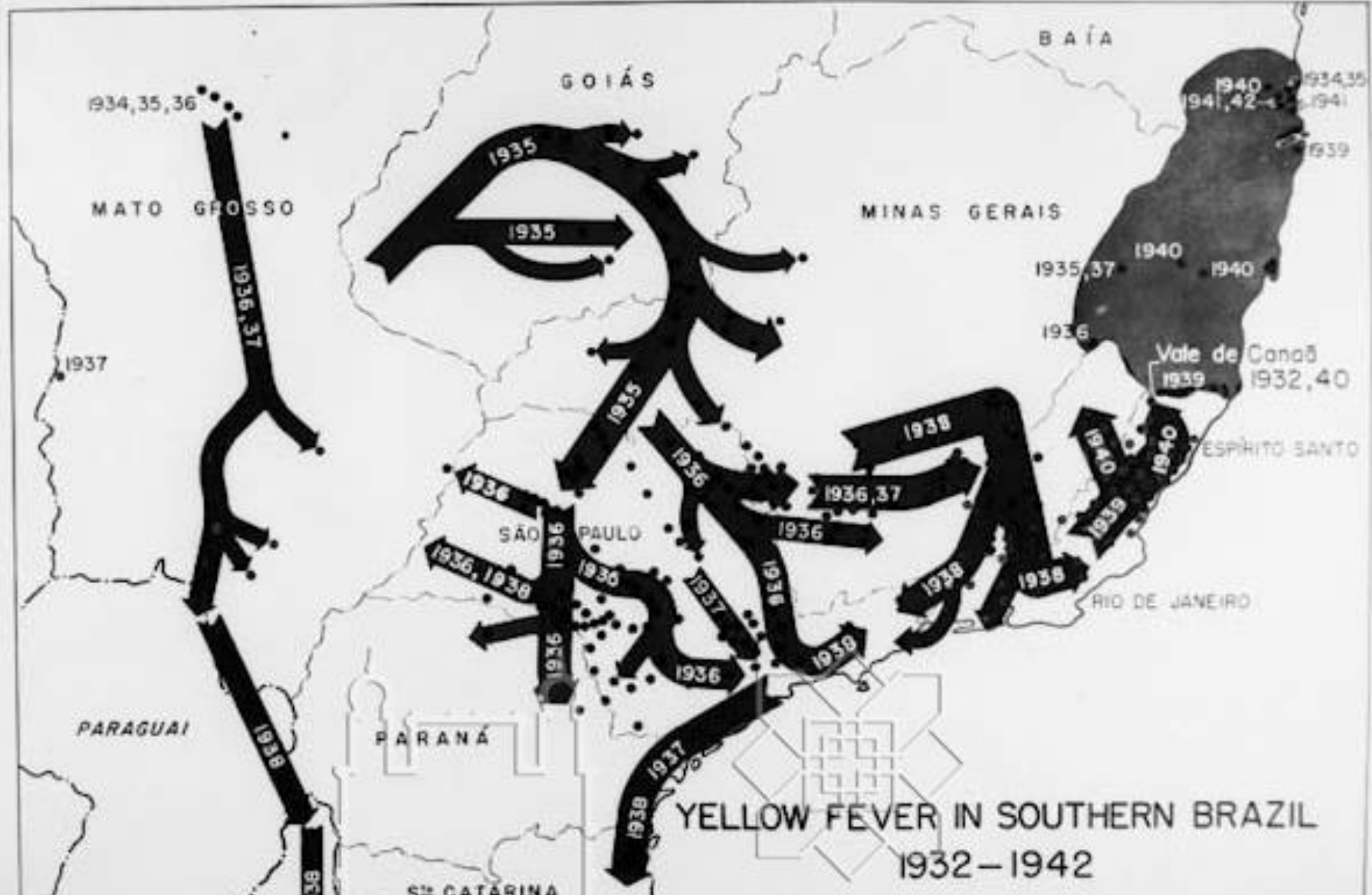
Desafios

- ✓ Inexistência de kits comerciais validados para detecção de anticorpos e antígeno NS1;
- ✓ Insumos para ELISA “*in house*” insuficientes e pouco específicos;
- ✓ Possibilidade de reações cruzadas com outros flavivírus;
- ✓ Amostras soros pareados;
- ✓ Sequenciamento direto de amostras positivas com baixos títulos;
- ✓ Necessidade de processar amostras de PNHs em NB3;
- ✓ Amostras de Callitrix com resultados discordantes com IQ
- ✓ Recursos humanos;
- ✓ Falta de informações nas fichas que acompanham as amostras: início dos sintomas, data de coleta, vacina, idade, etc
- ✓ Quantitativo de amostras de PNHs que chegam ao laboratório, existe necessidade de coletar amostras de PNHs em áreas com circulação já confirmada? Utilizar critérios mais qualitativos do que quantitativo.

CONCLUSÕES

- Ampliar a capacidade diagnóstica da rede de laboratórios;
- Descentralizar o diagnóstico;
- Necessidade de padronização de protocolos e reativos;
- Necessidade de estabelecer algoritmo de diagnóstico de casos de infecção natural e de EAPV;
- Promover estudos com Callitrix x infecção vírus febre amarela
- Revisar os critérios de vigilância de PNHs durante a ocorrência de epizootias;
- Reforçar a comunicação entre vigilância e laboratório;
- **Eliminar a febre amarela através de estratégias efetivas de vacinação**

Expansão da Febre amarela, sul e sudeste, 1932- 1942



Laboratório de Flavivírus / Serviço de Referência Regional

Ana Maria Bispo de Filippis, PhD – Chefe

Rita Maria R. Nogueira, PhD – Chefe substituta

Patrícia C Sequeira, PhD – Pesquisadora

Marco Aurelio Horta, PhD - Pesquisador

Marcos C Mendonça, PhD - Tecnologista

Eliane M de Araújo, BsC - Tecnologista

Simone A Sampaio, BsC - Tecnologista

Leda M Santos - Técnica

Nívia, BsC – Gerente da qualidade

Carolina Santos, BsC – Tecnologista terceirizada

Cíntia Damasceno , MSc – Tecnologista terceirizada

Ronaldo Lapa – Técnico terceirizado Suporte laboratorial

Solange Regina - Suporte Administrativo e Laboratorial

Everton Rodrigues, BsC – Técnico bolsista Zikaplan

Flávia Levy, MSc - Tecnologista ZikaPlan

Nieli Faria, PhD – Bolsista Pos-doc Canadian Institute

Bianca de Santis - Estudante de doutorado

Celeste Torres – Estudante de doutorado

Alisson Fabri – Estudante de mestrado

Lucas Carvalho– Aluno de Ensino Médio

Maria Luiza Lemos– Aluna de Ensino Médio

Visiting Scholar da Universidade de Liverpool

Raquel Medialdea-Carrera – PhD student



OBRIGADA!!

GRACIAS!!

Ana Maria Bispo de Filippis
abispo@ioc.fiocruz.br