

# Testes laboratoriais de diagnóstico da febre amarela em África

## Orientações provisórias

Julho de 2016

WHO/OHE/YF/LAB/16.1



## 1. Introdução

### 1.1 Antecedentes

Os actuais surtos de febre amarela em Angola e na República Democrática do Congo salientaram que a rápida confirmação laboratorial dos casos suspeitos de febre amarela é essencial para uma resposta eficaz.

Em 2010, as definições de casos de febre amarela, incluindo os critérios para os testes laboratoriais, foram estabelecidas numa reunião consultiva de peritos mundiais<sup>1</sup>. Estas orientações baseiam-se nessas definições de casos de febre amarela, esclarecendo que os tipos de testes que devem ser efectuados em situações de surtos e não surtos.

Embora os testes laboratoriais sejam uma parte essencial de um diagnóstico da febre amarela, a confirmação final deve ser feita numa base casuística, incluindo a análise da apresentação clínica, contexto epidemiológico e história de vacinação.

### 1.2 Público-alvo

Este documento destina-se a fornecer orientações ao pessoal dos laboratórios que executa os testes de diagnóstico da infecção pelo vírus da febre amarela. Fornece igualmente informação sobre o diagnóstico laboratorial aos clínicos que tratam dos doentes com suspeita de febre amarela e aos profissionais de saúde que participam nas actividades de vigilância e controlo da febre amarela.

## 2. Algoritmos dos testes de diagnóstico laboratorial para os países africanos em risco de febre amarela

### 2.1 Países com surtos

Durante os surtos, as estratégias de testes laboratoriais devem dar prioridade à confirmação de novos casos de transmissão local e minimizar o número de testes necessários para evitar sobrecarregar as capacidades. A **Figura 1** apresenta o meio de aplicar essa estratégia.

Os testes básicos necessários para a confirmação laboratorial da febre amarela durante um surto são:

- **Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)** para determinar o IgM do vírus da febre amarela. Outros flavírus – vírus da dengue, vírus do Nilo Ocidental e vírus Zika virus – podem dar um resultado falso positivo no ensaio ELISA para a febre amarela e, por isso, um painel ELISA para outros flavivírus esperados (conforme determinação da epidemiologia local) deve ser executado como diagnóstico diferencial.
- **reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) para o vírus da febre amarela.** Este teste deve ser efectuado em amostras colhidas no prazo de sete dias a partir do início dos sintomas.

Todas as amostras devem ser transportadas para laboratórios com informação apropriada sobre o doente (e.g., idade, sexo, local de residência, início dos sintomas, história de vacinação e história de viagens). Os resultados dos testes laboratoriais não podem ser interpretados correctamente sem essa informação. As amostras de sangue devem ser analisadas logo que possível, de preferência nas 24 horas seguintes à sua chegada ao laboratório. O momento em que o sangue foi colhido, isto é, o tempo decorrido após o início dos sintomas – afecta a interpretação dos resultados de ambos os testes. Por isso, é importante lembrar que a estimativa do tempo se baseia na história fornecida pelo doente, podendo nem sempre ser rigorosa.

Os actuais testes laboratoriais estabelecem uma diferença entre o IgM do vírus da febre amarela estimulado pela vacinação e o estipulado pela infecção com o vírus da febre amarela de tipo selvagem. Por isso, os resultados laboratoriais nas pessoas que foram vacinadas contra a febre amarela no prazo de 30 dias devem ser interpretados com cuidado (ver Figura 2) e avaliados numa base casuística, considerando a apresentação clínica e o contexto epidemiológico, juntamente com os resultados laboratoriais.

Se o laboratório nacional não puder efectuar um teste serológico apropriado do IgM do vírus da febre amarela e/ou RT-PCR, as amostras devem ser enviadas para um laboratório regional de referência da OMS (RRL) ou para o laboratório mais próximo com capacidade reconhecida para efectuar esses testes (ver Anexo 1).

Nos distritos em que a transmissão local ainda não foi confirmada, as amostras de sangue devem ser colhidas em todas as pessoas que sejam casos suspeitos de febre amarela. Se o laboratório tiver atingido a sua capacidade máxima, deve dar-se prioridade aos testes de amostras provenientes das zonas em que a transmissão local ainda não tenha sido confirmada. Não é essencial efectuar testes serológicos para diferenciar entre o vírus da febre amarela e outros

<sup>1</sup> O RT-PCR da febre amarela está actualmente validado apenas para amostras de sangue. Outras amostras, incluindo saliva e urina, poderão ser validadas no futuro para testes RT-PCR.

flavivírus em amostras de zonas em que a transmissão local já tenha sido confirmada. Contudo, todas as amostras devem ser devidamente armazenadas para futura análise, se necessário.

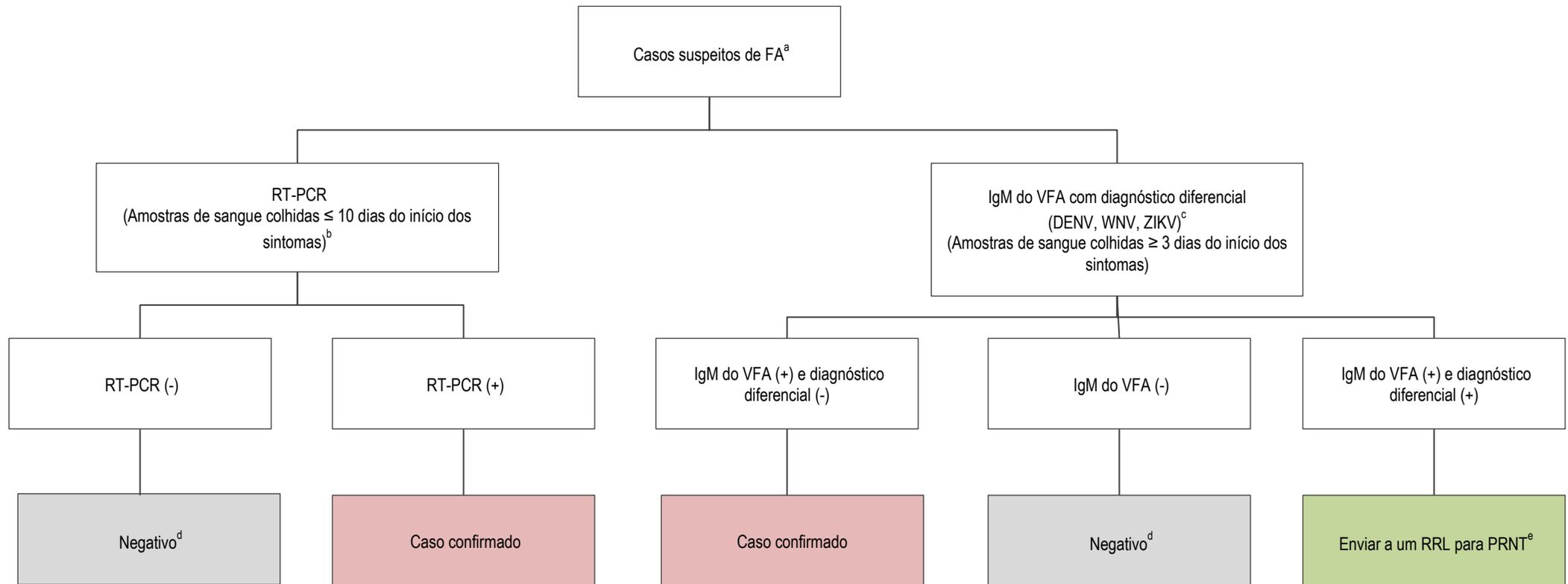
Um caso suspeito de febre amarela é laboratorialmente confirmado, se forem cumpridos os seguintes critérios:

- presença do ARN do vírus da febre amarela no sangue de uma pessoa sem história recente de vacinação contra a doença <sup>1</sup>

***ou***

- presença do anticorpo IgM específico do vírus da febre amarela, ausência de outros flavivírus relevantes (vírus da dengue, vírus do Nilo Ocidental, vírus Zika) e sem história de vacinação recente contra a febre amarela.

Figura 1. Algoritmo dos testes laboratoriais para casos suspeitos durante surtos de febre amarela: pessoas não vacinadas



FA = febre amarela; VFA = vírus da febre amarela; DENV = vírus da dengue; VNO = vírus do Nilo Ocidental; ZIKV = vírus Zika; LRR = laboratório regional de referência; PRNT = teste de neutralização por redução de placas

<sup>a</sup> Uma pessoa com início agudo de febre, com icterícia nos 14 dias seguintes ao início dos primeiros sintomas <sup>1</sup>

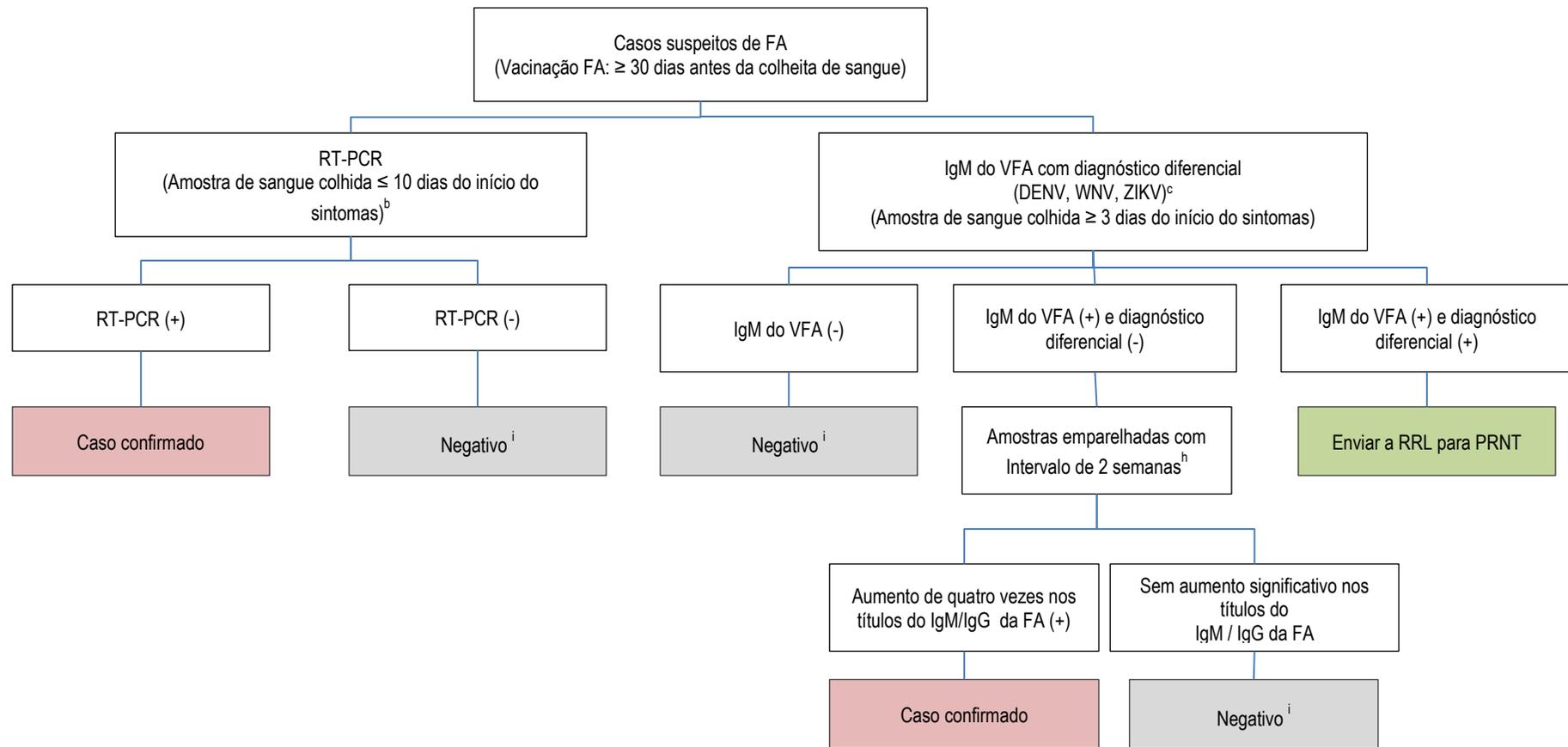
<sup>b</sup> Se RT-PCR for efectuado imediatamente após o início dos sintomas (< 3 dias), os casos negativos devem ser submetidos a novo teste 3 dias depois do início dos sintomas. Nas pessoas com sintomas clínicos graves, o RT-PCR poderá ser positivo durante mais de 10 dias após o início dos sintomas. Estão previstos testes de urina no futuro, mas ainda não foram validados. Quando forem introduzidos, é importante saber que, quando se faz a análise da urina por RT-PCR, o período de tempo após o início dos sintomas durante o qual o resultado pode ser positivo, poderá exceder 10 dias.

<sup>c</sup> O vírus da dengue e o vírus do Nilo Ocidental devem ser considerados potenciais agentes causadores de sintomas e podem dar resultado positivo para o IgM do VFA. Conforme a situação epidemiológica local, poderá ser necessário fazer testes para outros flavivírus (ELISA).

<sup>d</sup> Quando o sangue de pessoas com suspeita de febre amarela for negativo, tanto no teste RT-PCR como no de IgM do VFA, é considerado negativo para a FA. Contudo, um resultado negativo apenas num desses testes não exclui a infeção por febre amarela.

<sup>e</sup> Teste de neutralização por redução de placas.

Figura 2. Algoritmo dos testes laboratoriais para casos suspeitos durante surtos de febre amarela: pessoas que foram vacinadas/pessoas com história vacinal não definida<sup>ii</sup>



FA = febre amarela; VFA = vírus da febre amarela; DENV = vírus da dengue; VNO = vírus do Nilo Ocidental; ZIKV = vírus Zika; LRR = laboratório regional de referência; PRNT = teste de neutralização por redução de placas

<sup>b</sup> Se RT-PCR for efectuado imediatamente após o início dos sintomas (< 3 dias), os casos negativos devem ser submetidos a novo teste 3 dias depois do início dos sintomas. Nas pessoas com sintomas clínicos graves, o RT-PCR poderá ser positivo durante mais de 10 dias após o início dos sintomas. Estão previstos testes de urina no futuro, mas ainda não foram validados. Quando forem introduzidos, é importante saber que, quando se faz a análise da urina por RT-PCR, o período de tempo após o início dos sintomas durante o qual o resultado pode ser positivo, poderá exceder 10 dias.

<sup>c</sup> O vírus da dengue, o vírus do Nilo Ocidental e o vírus Zika devem ser considerados potenciais agentes causadores de sintomas e podem dar resultado positivo para o IgM do VFA. Conforme a situação epidemiológica local, poderá ser necessário fazer testes para outros flavivírus (ELISA).

<sup>h</sup> Este intervalo poderá ser encurtado, especialmente durante os surtos, porque dois dias poderão ser suficientes para um aumento de quatro vezes dos títulos do IgM do VFA, se o sistema imunitário libertar um anticorpo IgM específico <sup>2,3,4</sup>.

<sup>i</sup> Negativo para febre amarela: (i) RT-PCR (-) e IgM (-) para o vírus da febre amarela ou (ii) RT-PCR (-) e sem aumento significativo dos títulos IgM/IgG do VFA, com intervalo de duas semanas.

<sup>ii</sup> Este algoritmo aplica-se apenas à investigação de casos suspeitos nos distritos onde ainda não foi detectada transmissão local. Nos distritos que já confirmaram transmissão local, não é necessário diferenciar entre o IgM da febre amarela causado pela vacina e o causado pelo VFA selvagem e, por isso, esses distritos devem aplicar o algoritmo da Figura 1.

## 2.2 Países de risco sem surto actual

Nos países de risco que não tenham surtos confirmados de febre amarela, devem usar-se testes laboratoriais para detectar um primeiro caso (índice).

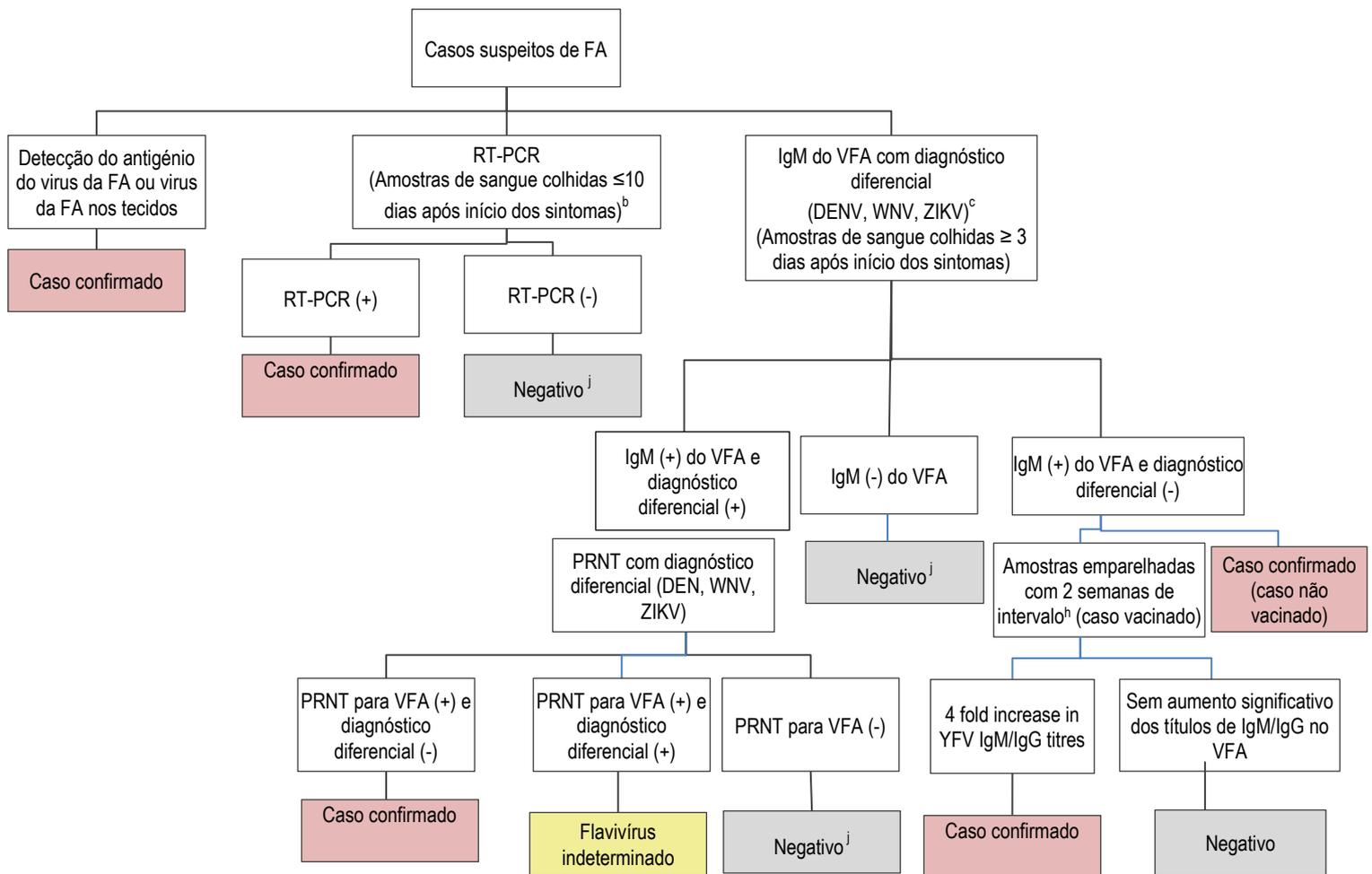
Quando se colhem amostras de sangue em pessoas que foram recentemente vacinadas ou cuja situação vacinal seja desconhecida, o teste de duas amostras – uma amostra inicial aguda e uma amostra convalescente mais tarde – pode determinar se a presença do IgM se deve a infecção pelo vírus da febre amarela. Se ocorrer um aumento de quatro vezes dos títulos IgM e/ou IgG do vírus da febre amarela entre a amostra aguda e a amostra de soro convalescente, pode ser confirmada a infecção por febre amarela.

Em resumo, um novo caso suspeito de febre amarela pode ser laboratorialmente confirmado por qualquer uma das seguintes ocorrências:

- presença de ARN do vírus da febre amarela no sangue colhido numa pessoa sem história recente de vacinação contra a febre amarela; **ou**
- aumento de quatro vezes dos títulos IgM e/ou IgG do vírus da febre amarela entre as amostras de sangue agudo e convalescente; **ou**
- presença de anticorpos neutralizadores da febre amarela e ausência de outros flavivírus (vírus da dengue, vírus do Nilo Ocidental ou vírus Zika) no sangue colhido numa pessoa sem história de vacinação contra a febre amarela; **ou**
- detecção do antígeno da febre amarela por imunoenaios em tecidos de uma pessoa sem história de vacinação recente contra a febre amarela; **ou**
- isolamento do vírus da febre amarela no sangue ou tecidos se uma pessoa sem história recente de vacinação contra a febre amarela.

(Ver Figura 3 abaixo para mais informação)

Figura 3. Algoritmo dos testes laboratoriais para casos suspeitos em locais sem surtos



<sup>b</sup> Se RT-PCR for efectuado imediatamente após o início dos sintomas (< 3 dias), os casos negativos devem ser submetidos a novo teste 3 dias depois do início dos sintomas. Nas pessoas com sintomas clínicos graves, o RT-PCR poderá ser positivo durante mais de 10 dias após o início dos sintomas. Estão previstos testes de urina no futuro, mas ainda não foram validados. Quando forem introduzidos, é importante saber que, quando se faz a análise da urina por RT-PCR, o período de tempo após o início dos sintomas durante o qual o resultado pode ser positivo, poderá exceder 10 dias

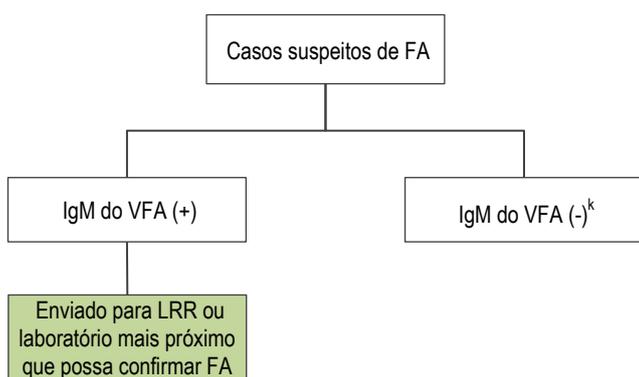
<sup>c</sup> O vírus da dengue, o vírus do Nilo Ocidental e o vírus Zika devem ser considerados potenciais agentes causadores de sintomas e podem dar resultado positivo para o IgM do VFA. Conforme a situação epidemiológica local, poderá ser necessário fazer testes para outros flavivírus (ELISA).

<sup>h</sup> Este intervalo poderá ser encurtado, especialmente durante os surtos, porque dois dias poderão ser suficientes para um aumento de quatro vezes dos títulos do IgM do VFA, se o sistema imunitário libertar um anticorpo IgM específico <sup>2,3,4</sup>.

<sup>j</sup> Negativo para febre amarela: (i) PCR (-) e IgM (-) para o vírus da febre amarela ou (ii) PCR (-) e PRNT para a febre amarela (-)

Se os laboratórios nacionais não conseguirem confirmar a doença pelo vírus da febre amarela, as amostras que apresentaram resultado positivo para o IgM do vírus da febre amarela devem ser enviadas para um LRR, tão rapidamente quanto possível (ver Figura 4). Quando os laboratórios nacionais introduzirem RT-PCR para a febre amarela em várias amostras (e.g. sangue/soro, saliva e urina) e os testes serológicos conseguirem diferenciar entre os flavivírus, o algoritmo mudará.

**Figura 4. Algoritmo dos testes laboratoriais para casos suspeitos em locais sem surtos, onde a capacidade para confirmar a infecção pelo vírus da febre amarela seja limitada**



<sup>k</sup> Se uma amostra de sangue tiver sido colhida dentro dos 7 dias seguintes ao início dos sintomas, deverá colher-se uma segunda amostra 7 dias ou mais depois do início dos sintomas e analisá-la novamente.

### 3. Transporte de amostras

O transporte correcto de amostras para um laboratório regional de referência, com redes de laboratório estabelecidas (e.g., poliomielite, sarampo, gripe ou a Rede de Laboratórios para Agentes Patogénicos Emergentes e Perigosos (EDPLN)<sup>i</sup>) requer um planeamento antecipado, embalagens e rótulos apropriados, documentação e comunicação entre todas as partes envolvidas. As amostras para testes moleculares ou serológicos devem ser mantidas a 4-8 °C e se puderem ser transportadas no prazo de um dia para o laboratório de diagnóstico. Se estiver previsto que o transporte leve mais de um dia, as amostras de soro devem ser congeladas a -20 °C. Uma manipulação errada das amostras afectará a qualidade dos resultados do diagnóstico.

Ver *Manual para a monitorização da infecção pelo vírus da febre amarela*<sup>3</sup>, disponível em:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68715/1/WHO\\_IVB\\_04.08.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68715/1/WHO_IVB_04.08.pdf)

## 4. Indicadores

Os seguintes indicadores constituem referências para determinar se a capacidade dos laboratórios é suficiente para apoiar uma resposta a um surto de febre amarela.

Laboratório	Período de tempo necessário (dias)	Referência
Laboratório nacional	Amostra chegou – amostra analisada (IgM do vírus da febre amarela com diagnóstico diferencial, RT-PCR)	≤ 1 dia
	Amostra chegou – amostra enviada para LRR	≤ 3 dias
Laboratórios regionais de referência	Amostra enviada pelo laboratório nacional – resultados recebidos do LRR (IgM do vírus da febre amarela com diagnóstico diferencial, RT-PCR)	≤ 5 dias
	Amostra enviada pelo laboratório - resultados recebidos do LRR (PRNT)	≤ 10 dias

## 5. Elaboração das orientações

### 5.1 Agradecimentos

Estas orientações foram elaboradas por um grupo director interno constituído por pessoal da OMS/Genebra (Philippe Barboza, Mauricio Bellerferri, Pierre Formenty, Erika Garcia, Margaret Harris, Qiu Yi Khut, Miguel Norman Mulders, Dhamari Naidoo, Kyohei Nishino, Susan Norris, William Perea e Sergio Yactayo); Escritório Regional da OMS para a África (Yahaya Ali Ahmed, Joseph Nsiari-Muzeyi Biey, Annick Ayélé Dosseh, Richard Ray Luce Jr e Jean-Bosco Ndiokubwayo); Escritório Regional da OMS para as Américas (Jairo Andres Mendez Rico); Escritório Regional da OMS para o Mediterrâneo Oriental (Humayun Asghar); Escritório Regional da OMS para o Sudeste Asiático (Aparna Singh Shah); e Escritório Regional da OMS para o Pacífico Ocidental (Franciscus Konings).

O grupo externo de elaboração das orientações foi constituído pelos seguintes peritos, que analisaram e fizeram a revisão das versões inicial e final: Maurice Demanou, Centre Pasteur Cameroon, Yaoundé, Cameroon; Barbara Johnson, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, United States of America Koichi Morita, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan; Matthias Niedrig, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany; Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil; and Herve Zeller, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.

### 5.2 Métodos de elaboração das orientações

Estas orientações baseiam-se na definição de casos de febre amarela desenvolvida e publicada em 2010 (1). As

orientações usam a definição de casos, conforme estabelecida em 2010, mas explicam que testes devem ser efectuados em situações de surto e não surto. A primeira versão foi elaborada por um grupo director interno (ver Agradecimentos acima) constituído por pessoal da Sede e dos Escritórios Regionais da OMS. Esta versão foi depois distribuída aos membros de um grupo de revisores externos constituído por pessoas com conhecimentos técnicos em testes laboratoriais e virologia, originários das Regiões das Américas, Europa e Pacífico Ocidental (ver a lista completa em Agradecimentos), que foram identificados através da Rede de Centros de Colaboração da OMS. O grupo de revisão externo analisou o projecto de orientações através de correio electrónico e apresentou observações e comentários por escrito, que foram incorporados no documento revisto. Este documento foi depois analisado por todos os participantes pela segunda vez e os contributos recebidos foram incorporados no documento final.

### 5.3 Declaração de interesses

A partir das declarações de interesses apresentadas, não foram identificados quaisquer conflitos de interesses. Não foram utilizados quaisquer fundos específicos para a elaboração deste guia.

### 5.4 Data da revisão

Estas recomendações foram produzidas sob procedimentos de emergência e permanecerão válidas até Dezembro de 2016. O grupo director interno que elaborou este guia será responsável por rever o seu conteúdo, nessa altura, actualizando-o, onde for necessário.

## 6. Referências

1. Weekly Epidemiological Record 2010. Geneva: World Health Organization; 2010. (<http://www.who.int/wer/2010/wer8547.pdf> accessed 26 May 2016)
2. [Verstrepen BE](#), [Fagrouch Z](#), [van Heteren M](#), [Buitendijk H](#), [Haaksma T](#), [Beenhakker N](#), et al. Experimental infection of rhesus macaques and common marmosets with a European strain of West Nile virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 17;8(4):e2797. doi: 10.1371/journal.pntd.0002797. eCollection 2014.
3. [Panning M](#), [K. Grywna](#), [van Esbroeck M](#), [Emmerich P](#), [Drosten C](#). Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008 Mar; 14(3): 416–422. doi: [10.3201/eid1403.070906](https://doi.org/10.3201/eid1403.070906).
4. [Hunsperger EA](#), [Muñoz-Jordán J](#), [Beltran M](#), [Colón C](#), [J. Carrión J](#), [Vazquez J](#), et al. Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm. *J Infect Dis*. (2016) doi: 10.1093/infdis/jiw103.
5. Manual for the monitoring of febre amarela virus infection. Geneva: World Health Organization; 2004. ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68715/1/WHO\\_IV\\_B\\_04.08.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68715/1/WHO_IV_B_04.08.pdf), accessed 26 May 2016).

© World Health Organization 2016

All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO website ([www.who.int](http://www.who.int)) or can be purchased from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: [bookorders@who.int](mailto:bookorders@who.int)).

Requests for permission to reproduce or translate WHO publications –whether for sale or for non-commercial distribution– should be addressed to WHO Press through the WHO website ([www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

## Anexo 1. Laboratórios para confirmação da febre amarela

Região	Laboratório ( cidade, país)
África	<b>Institut Pasteur in Dakar (Dakar, Senegal)*</b>
	International Centre for Medical Research in Franceville (Franceville, Gabon)
	Kenya Medical Research Institute (Nairobi, Kenya)
	National Institute for Communicable Diseases (Johannesburg, South Africa)
	Noguchi Memorial Institute for Medical Research (Accra, Ghana)
	Uganda Virus Research Institute (Entebbe, Uganda)
Américas	<b>Instituto Evandro Chagas (Belem, Brazil)*</b>
	<b>Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (Pergamino, Argentina)*</b>
	<b>Institut Pasteur in French Guiana (Cayenne, French Guiana)*</b>
	<b>Instituto Pedro Kouri (Habana, Cuba)*</b>
	<b>Centers for Disease Control and Prevention (Fort Collins, United States of America)*</b>
	<b>Centers for Disease Control and Prevention- Puerto Rico (San Juan, Puerto Rico-United States of America)*</b>
	Instituto Nacional de Salud (Bogota, Colombia)
	Instituto Nacional de Salud (Lima, Peru)
Mediterrâneo Oriental	Central Public Health Laboratory (Cairo, Egypt)
	Central Public Health Laboratory (Khartoum, Sudan)
	Health Laboratory (Tehran, Iran)
	National Institute of Health (Islamabad, Pakistan)
	Public health laboratory (Manama, Bahrain)
	Rafiq Harairi Hospital (Beirut, Lebanon)
	Virology Lab (Rabat, Morocco)
Europa	<b>Robert Koch-Institut ( Berlin, Germany)*</b>
	Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (Hamburg, Germany)
	The State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR (Novosibirsk, Russia)
	Institut Pasteur in Paris (Paris, France)
	Rare and Imported Pathogens Laboratory, Public Health England (London, the United Kingdom)
	Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» (Saratov, Russia)
Sudeste Asiático	National Institute of Virology (Pune, India)

\*Laboratórios Regionais de Referência da OMS para a febre amarela