

PRINCIPAIS ASPECTOS DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FEBRE AMARELA

Ana Paula Doria¹

Marcos Montanha Ramos²

RESUMO

Com o surgimento de periódicos surtos isolados ou epidemias, a febre amarela tem tido grande impacto em saúde pública. Sabe-se da grande dificuldade para o diagnóstico da doença e assim, torna-se de extrema importância um diagnóstico laboratorial de qualidade. Este pode ser esquematicamente dividido em “Diagnóstico Imunológico”, “Diagnóstico Molecular” e “Diagnóstico Histopatológico”, este artigo engloba as principais vantagens e desvantagens de cada metodologia citada. O presente trabalho apresenta-se como uma pesquisa bibliográfica englobando literaturas relevantes em relação ao tema apresentado.

Palavras-chave: Febre amarela. Diagnóstico Laboratorial. Imunologia. Biologia molecular. Histopatologia.

¹ Biomédica – UNIMAR: Universidade de Marília. Especializando em Análises Clínicas e Moleculares pela Academia de Ciência e Tecnologia – AC&T

² Biólogo – USC: Universidade do Sagrado Coração. Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica pela UNESP.

1 – Introdução

1.1 – A doença

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando periodicamente surtos isolados ou epidemias maiores ou menores que se mantém endêmica causando impacto na saúde pública, sendo transmitida ao homem mediante a picada de insetos hematófagos da família *Culicidae* (*arbovirose*), em especial dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus* (VASCONCELOS, 2003).

Apresenta-se como uma doença febril aguda, de curta duração (máximo 12 dias) e de gravidade variável. A forma grave caracteriza-se clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, que podem evoluir para uma maior gravidade. (BRASIL, 1999)

O vírus da febre amarela é mantido por dois ciclos básicos: um silvestre, onde os mosquitos responsáveis pela transmissão diferem na América e na África, e um ciclo urbano, onde o mosquito *Aedes aegypti* é o responsável pela disseminação da doença nos dois continentes. Neste ciclo, a transmissão pelo *Aedes aegypti* é feita diretamente ao homem. Este, uma vez infectado, pode desenvolver a doença e serve de fonte de infecção para novos mosquitos, perpetuando assim o ciclo, até que se esgotem os susceptíveis ou se realize vacinação em massa da população para interromper a transmissão (VASCONCELOS, 2002).

1.2 – O vírus

O vírus pertence ao gênero Flavivírus, família Flaviviridae, mesmo gênero e família de outros vírus responsáveis por doença em humanos, entre as quais dengue, West Nile, Rocio e encefalite de St. Louis; é um vírus RNA, de polaridade positiva, com aproximadamente 11kb de comprimento e uma única fase aberta de leitura (*Open Reading Frame – ORF*) de aproximadamente 10.800 nucleotídeos que codificam cerca de 3.400 aminoácidos. Esta região é flanqueada por duas regiões não codificantes

(NCR), 3'NCR com cerca de 511 nucleotídeos e 5'NCR com aproximadamente 118 nucleotídeos, importantes para a regulação e expressão do vírus (BRASIL, 1999 e VASCONCELOS, 2003).

1.3 – Histórico da Doença

Até pouco tempo, desconhecia-se a origem do vírus, não se sabia se ele era nativo das Américas ou teria sido introduzido no continente com o comércio de escravos vindos da África. Com o advento da Biologia Molecular, pôde-se mostrar que os vírus encontrados na América, apresentaram deleção em uma seqüência repetitiva do genoma na região 3'NCR, o que não ocorreu nas amostras providas do continente Africano. Isto praticamente define a origem do vírus como Africano. (VASCONCELOS, 2003)

1.4 - Epidemiologia

Em relação aos grupos populacionais com risco de adquirir a doença, sabe-se que pode-se considerar que todas as pessoas não vacinadas e que se submetem às picadas dos transmissores infectados em áreas de floresta, dentro da área endêmica da virose (especialmente onde esteja ocorrendo circulação do vírus) podem vir a adquirir a doença.

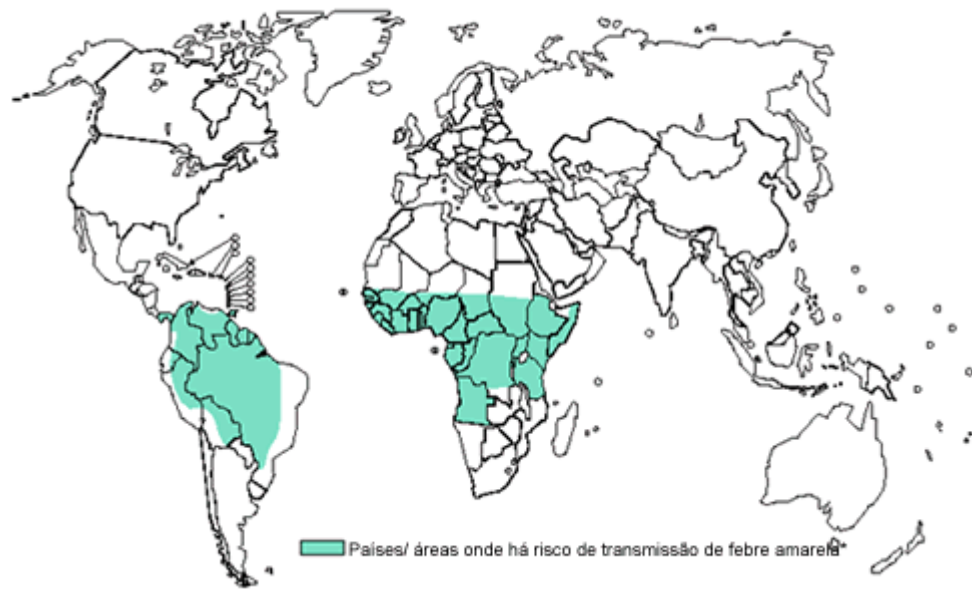
No Brasil, as áreas de risco (endêmica e epizootica ou de emergência) incluem as regiões Norte, Centro Oeste, o estado do Maranhão e a parte ocidental dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Nestas áreas, a doença ocorre principalmente entre lenhadores, seringueiros, vaqueiros, garimpeiros, caçadores, ribeirinhos dos rios amazônicos e em turistas, principalmente com idade variando entre 14 a 35 anos. Essa preferência se deve à maior exposição e não a uma possível maior susceptibilidade ao vírus (VASCONCELOS, 2002).

A letalidade global da febre amarela situa-se entre 5 e 10%, mas, nos casos graves que necessitam de hospitalização, oscila de 40% a 60% (MONATH, 1988).

1.5 Situação da Febre Amarela no Brasil e no Mundo

Em relação à situação da doença a nível mundial, as áreas de maior concentração estão indicadas na figura 1.

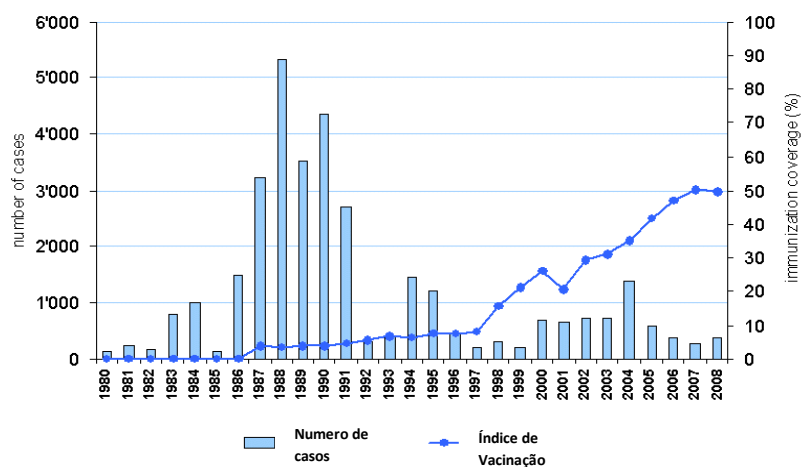
Figura 1: Áreas de risco de transmissão da Febre Amarela no Mundo.



Fonte: Modificado de WHO, 2009

A figura 2 representa a incidência da doença em relação à vacina nos anos entre 1980 e 2008, de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

Figura 2 Casos de Febre Amarela relatados anualmente, em relação ao índice de vacinação entre 1980 e 2008.



Fonte: Modificado de WHO, 2009

O Ministério da Saúde, no Brasil, recomenda que algumas regiões do país efetuem campanhas de vacinação contra a Febre Amarela. Estas regiões estão representadas na Figura 3, abaixo.

Figura 3 – Áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela, Brasil, 2008/2009.



Fonte: Modificado de BRASIL, 2010 (b)

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é analisar as principais metodologias e conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado, para o diagnóstico laboratorial da Febre Amarela e discorrer criticamente sobre os mesmos.

Este trabalho justifica-se devido à dificuldade no diagnóstico da Febre Amarela, bem como pela necessidade de diferenciação desta com outras patologias com sintomas semelhantes.

2 – Desenvolvimento

O Diagnóstico Laboratorial da doença pode ser didaticamente dividido em “Diagnóstico Imunológico”, “Diagnóstico Molecular” e “Diagnóstico Histopatológico”. As principais metodologias utilizadas de ambos estão descritas abaixo:

2.1 – Diagnóstico Imunológico

Apesar de o diagnóstico molecular ser o teste confirmatório, o imunológico é o mais empregado atualmente.

Dentre os testes imunológicos, destaca-se a utilização da metodologia de Reação imunoenzimática de captura de IgM (Mac-ELISA), sendo indicada para o diagnóstico de infecção recente.

Os imunoenaios enzimáticos do tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) são amplamente utilizados em todo o mundo devido à facilidade metodológica, custo reduzido e potencial de automação (Pawlosky, 1999). A reação antígeno-anticorpo realizada em placas de poliestireno é revelada com a utilização de anticorpos secundários marcados com uma enzima. A presença de anticorpos no material biológico é revelada pela ação da enzima sobre seu substrato específico, o qual é adicionado à placa, gerando uma reação de oxidação que modifica a cor do sobrenadante. A leitura é realizada utilizando espectrofotômetro ou leitoras automáticas em absorbância no comprimento de onda entre 340 e 650 nm. A absorbância detectada é proporcional a quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra testada (CARON e FLORES, 2008).

O teste ELISA-IgM é muito útil no diagnóstico rápido das infecções correntes e/ou recentes, pois usualmente esta imunoglobulina surge na primeira semana após o início dos sintomas, alcança um pico na segunda semana e perdura por 2 a 3 meses (ARAÚJO *et al*, 1999 e RIBEIRO E ANTUNES, 2009),

Alguns autores descrevem a possibilidade de diagnóstico da doença pela técnica de Imunofluorescência Direta (IFD), utilizando material de biópsia hepática (Schatzmayr, 1984). A biópsia hepática confirma o diagnóstico pela demonstração do vírus nos tecidos hepáticos, por imunofluorescência direta, hibridização in situ ou PCR. O estudo histopatológico, já nos primeiros dias da doença, pode sugerir o diagnóstico, embora não seja patognomônico. A biópsia hepática está contra-indicada, em virtude do risco de sangramento. O material hepático obtido no momento do óbito pode, entretanto, ser submetido a exame histopatológico para o diagnóstico retrospectivo. As lesões hepáticas características estão presentes apenas nas fases iniciais da doença; posteriormente, o quadro pode ser confundido com hepatites virais (MARTINS E SETÚBAL, 1990; SETÚBAL e SANTOS OLIVEIRA, 1994).

O teste de IFD é empregado na pesquisa e na localização de antígeno em células ou tecidos, através de um anticorpo específico marcado com fluorocromo (conjugado). O conjugado se fixa ao antígeno, formando um imunocomplexo estável. O anticorpo não ligado é removido por lavagens e o preparo é observado em microscópio de fluorescência (FERREIRA E ÁVILA, 1996)

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) também pode ser utilizado no diagnóstico laboratorial da doença (BRASIL, 1999)

Imunofluorescência Indireta consiste em antígenos padronizados fixados à lâmina de vidro, o soro do paciente é diluído, colocado sobre o antígeno e incubado para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Após lavagens a preparação é incubada com o conjugado fluorescente e se houver anticorpo no soro, o conjugado (fluoresceína ligada à antimunoglobulina) reage com anticorpo específico para o antígeno. Utilizando-se diluições seriadas do soro, é possível determinar o título de anticorpos que será a máxima diluição em que se observa a fluorescência (FERREIRA E ÁVILA, 1996).

Outros testes imunológicos, freqüentemente utilizados são a Inibição da Hemaglutinação (IH), a Fixação do Complemento e o Teste de Neutralização (BRASIL, 1999).

A Inibição da Hemaglutinação é um teste de boa sensibilidade, de fácil execução e requer equipamentos simples, porém tem baixa especificidade. É ideal para inquéritos sorológicos, uma vez que os anticorpos IH persistem por um longo período de tempo, e são usualmente detectados em casos de resposta primária (a partir da primeira semana da doença). Em casos de resposta secundária, altos títulos de anticorpos IH podem ser precocemente detectados (2 a 3 dias após o início da febre) (BRASIL, 1999)

A Fixação de Complemento é um teste de maior especificidade que a IH. A presença de anticorpos é indicativa de infecção recente. Os anticorpos detectados aparecem durante a 5ª semana após o início dos sintomas e declinam rapidamente a baixos níveis, 6 a 12 meses após a infecção. No entanto, alguns estudos mostram que anticorpos podem persistir em títulos moderados ou elevados por períodos mais prolongados (até 2 anos) (BRASIL, 1999).

O Teste de Neutralização é o mais específico. Detecta anticorpos neutralizantes que aparecem tão precocemente quanto os anticorpos IH, durante a primeira semana da doença e permanecem por muitos anos. Os anticorpos neutralizantes são protetores e se caracterizam pela capacidade de reduzir ou eliminar a infectividade do vírus. (BRASIL, 1999)

2.2. Diagnóstico Imunológico diferencial:

O diagnóstico da febre amarela é de difícil realização, pois pode ser confundido com outras doenças infecciosas, assim, é necessário que se faça o diagnóstico diferencial da doença.

2.2.1 Com as Formas Leves e Moderadas

O diagnóstico diferencial é amplo, devendo ser feito com as doenças infecciosas do trato respiratório, digestivo e urinário. Na evolução observa-se aumento discreto das transaminases reforçando a suspeita clínica de febre amarela.

2.2.2 Com as Formas Graves

Leptospirose: manifestações digestivas são menos pronunciadas. Hemorragias são mais tardias. Os níveis de transaminases estão discretamente aumentados. Hemossedimentação e mucoproteínas aumentadas são favoráveis à leptospirose;

Malária por *P. falciparum*: as formas graves, nos primeiros dias, apresentam quadro clínico compatível com o de febre amarela. Na malária a anemia é precoce, com a presença de esplenomegalia, menor tendência hemorrágica e aumento discreto das transaminases. A pesquisa do parasita no sangue confirma imediatamente o diagnóstico. Pode haver concomitância das duas doenças, uma vez que ambas podem ser adquiridas nas mesmas condições epidemiológicas;

Hepatite viral: pode ser confundida com a febre amarela, uma vez que a icterícia, sintomas digestivos e sangramento são comuns em ambas. Na hepatite a febre é pouco acentuada ou ausente. Os níveis sanguíneos de uréia e creatinina são normais e há ausência de albuminúria;

Septicemia por gram negativo cursando com icterícia: apresenta menor frequência de hemorragias e há aumento discreto das transaminases. A existência de portas de entrada e hemocultura positiva fecham o diagnóstico;

Febre Maculosa Brasileira: lesões de porta de entrada e lesões exantemáticas que surgem após o 3º dia da doença, bem como o início tardio da icterícia, permitem orientar o diagnóstico na presença de dados epidemiológicos compatíveis;

Febres hemorrágicas virais: este grupo complexo de doenças, produzidas por arbovírus, que inclui a febre hemorrágica do dengue, constitui o maior problema de diagnóstico diferencial, uma vez que os dados clínicos e epidemiológicos têm vários pontos comuns. O diagnóstico diferencial é possível mediante investigação epidemiológica, identificação do vírus, estudos

sorológicos, alterações histopatológicas típicas e conhecimento de áreas de incidência dessas doenças.

O quadro abaixo mostra os principais diagnósticos diferenciais da febre amarela, de maneira resumida (BRASIL, 1999).

Quadro 1: Principais Diagnósticos Diferenciais da Febre Amarela

FORMA	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	OBSERVAÇÕES
Leve e Moderada	*Doenças infecciosas do trato respiratório, digestivo e urinário; *Hepatite subaguda.	O aumento discreto das transaminases reforça a suspeita de febre amarela.
Grave Formas *ícterodigestiva, *ícterohemorrágica *ícterohemorrágica-renal	*Leptospirose; *Malária; *Hepatite viral; *Septicemia com icterícia; *Febre Maculosa; *Febre Hemorrágicas virais; *Intoxicações por fósforo, halotano e outros.	As possíveis hipóteses diagnósticas devem ser corroboradas por dados epidemiológicos, clínicos e exames específicos.

Fonte: Modificado de BRASIL, 1999

2.3 – Diagnóstico Molecular

Um dos testes qualitativos mais utilizados na Biologia Molecular, é a Reação em Cadeia da Polimerase, precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) a qual pode detectar amostras positivas com até, aproximadamente, 50 cópias de RNA/mL, revelando uma sensibilidade analítica altamente superior aos ensaios imunológicos (BRANDÃO-MELLO *et al.*, 2001).

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar as tarefas de quantificação de carga viral e da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica.

O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, através da utilização de sondas específicas (FLEURY, 2007).

2.4 - Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico da febre amarela grave é realizado a partir de espécimes obtidos “post-mortem”. As lesões anatomopatológicas podem ser encontradas no fígado, rins, baço, coração e linfonodos. As maiores alterações encontram-se no fígado e rins (BRASIL, 1999).

2.5 – Casos da Doença na região centro-oeste paulista

No ano de 2009, na região do centro-oeste paulista, foram confirmados alguns casos da doença, deixando assim, aproximadamente 300 municípios em estado de alerta, fato este que levou o Ministério da Saúde, em conjunto com as Secretarias de Saúde Municipais a desencadear uma campanha de vacinação em larga escala nesta região (FMB, 2009 e JORNAL O GLOBO, 2009).

3 – Conclusão

Neste contexto, onde a febre amarela apresenta-se como um desafio aos órgãos públicos nacionais, devido ao surgimento periódico de surtos isolados ou epidemias de impacto em saúde pública, bem como a dificuldade para o diagnóstico da mesma; este trabalho conclui que é de extrema importância que se faça um diagnóstico laboratorial preciso da doença.

Os testes moleculares, apesar de nas últimas décadas terem sido considerados como padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de diversas patologias, apresentam algumas limitações, tais quais, a grande dificuldade de padronização do método, necessidade de laboratórios especializados, bem como custo elevado, em relação a outros métodos.

De acordo com Pawlosky, os testes imunológicos são largamente utilizados nos dias atuais, devido à facilidade metodológica, custo reduzido e potencial de automação. Este trabalho está de acordo com Pawlosky, porém, devido ao fato do diagnóstico desta doença ser muitas vezes confundido com outras doenças infecciosas, é necessário que se faça o diagnóstico diferencial da doença, levando a um diagnóstico de qualidade, podendo o paciente assim, receber o tratamento adequado da doença.

O diagnóstico histopatológico tem grande importância para fins epidemiológicos e de isolamento viral para estudos, porém, não possibilita o tratamento do paciente, já que este é realizado apenas em amostras “post-mortem”.

REFERÊNCIA

ARAUJO, T.P. et al. Diagnóstico sorológico de infecções por Dengue e Febre Amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999. Brasil. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v.35, n.6, p.579-584, 2002.

BRANDÃO-MELLO, C.E. et al. Hepatitis C and liver disease in Hemophilia. **Hepatology**, v.19, p. 441-443, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela**. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/profissionais.php>>. Acesso em: 10 Maio 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela: orientação ao viajante**. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/paf/viajantes/febre_amarela.htm#7>. Acesso em: 14 Maio 2010b.

CARON, L.; FLORES, E. **DNA diagnóstico virológico**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2008. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/sv/tecnicas.html>>. Acesso em: 24 out. 2008.

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - FMB. **Ministério da Saúde divulga nota sobre febre amarela**. Botucatu, 2009. Disponível em: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:mrdYjgx6WY8J:www.fmb.unesp.br/noticia_detalhes.php%3FvID%3D775+febre+amarela&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&ie=UTF-8>. Acesso em: 09 Abr. 2010.

FEBRE amarela assusta 300 cidades do interior paulista. **Jornal o Globo**, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/sp/mat/2008/01/08/febre_amarela_assusta_300_cidades_do_interior_paulista-327931335.asp>. Acesso em: 09 Abr. 2010.

FERREIRA, A.W.; ÀVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial. Avaliação de Métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias autoimunes. Correlação clínico-laboratorial. **Rev. Inst. Med. Trop. São. Paulo**, v.38, n. 4, p.264, 1996.

FLEURY MEDICINA E SAÚDE. **PCR quantitativo em tempo real (real-time PCR)**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualHematologia/pages/PCRQuantitativoemTempoRealReal-TimePCR.aspx>>. Acesso em: 22 Mar 2010.

MARTINS, F.S.V.; SETÚBAL, S. **Dengue**: diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Secretaria de Estado de Saúde, 1990. 54p. (Informe técnico, 3).

MONATH, T.P. **Yellow fever**. In: _____. (Ed.) **The arboviruses**: ecology and epidemiology. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.5, p.139-241.

PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C. **J. Hepatol.**, v.31, n.1, p.71-79, 1999.

RIBEIRO, M.; ANTUNES, C.M.F. Febre amarela: estudo de um surto, Brasil. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v.42, n.5, p.523-531, 2009.

SCHATZMAYR, H.G. et al. Demonstração por imunofluorescência direta de antígenos do vírus da febre amarela em tecido hepático pré-tratado com tripsina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.79, n.1, p.93-99, 1984.

SETÚBAL, S.; SANTOS OLIVEIRA, L.H. **Flaviviridae**: virologia humana. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev. Brás. Epidemiol.*, v.5, n.3, p.244-258, 2002.

VASCONCELOS, P.F.C. Yellow fever. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v.36, n.2, p.275-293, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Yellow fever**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/yellow_fever/en/index.html>. Acesso em: 15 Maio 2010.