

Artigo Original

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiana Brasil Ervedosa^[1]  ID, Pedro Enrique Navas-Suárez^[1,2]  ID, Eduardo Ferreira Machado^[1,2]  ID, Rodrigo Albergaria Ressio^[1]  ID, Cinthya dos Santos Cirqueira^[1]  ID, Isis Paixão de Jesus^[1]  ID, Julia de Carvalho^[1]  ID, Ketlyn Bolsachini Figueiredo^[3]  ID, Mariana Sequetin Cunha^[4]  ID, Leila del Castillo Saad^[5]  ID, Tatiana Lang D'Agostini^[5]  ID, Roberta Fernandes Spinola^[5]  ID, Juliana Mariotti Guerra^[3]  ID, Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes^[1,2]  ID

1. Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

2. Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

3. Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

4. Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

5. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

Autor para correspondência

Natália C. C. de A. Fernandes

E-mail: patologia.animal@ial.sp.gov.br

Instituição: Instituto Adolfo Lutz | Centro de Patologia Núcleo de Anatomia Patológica

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, nº 355, 7º andar. CEP: 01246-000. São Paulo/SP

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiana Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Resumo

O Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (CPA-IAL) é credenciado pelo Ministério da Saúde como laboratório de referência macrorregional para a vigilância epidemiológica de febre amarela (FA) em seres humanos e primatas não humanos (PNH) do Brasil, atuando por meio de análise histopatológica e imuno-histoquímica (IHQ). Até o ano de 2018, ambos os exames eram aplicados a todas as amostras de PNH recebidas para a pesquisa de FA. Em 2019, implantou-se um algoritmo diagnóstico baseado na triagem pelas características histopatológicas observadas no tecido hepático, possibilitando a racionalização do uso da IHQ. **Objetivo:** Avaliar a aplicação do algoritmo diagnóstico comparado ao período que antecedeu sua implantação. **Métodos:** Estudo retrospectivo de relatórios anatomicopatológicos de PNH emitidos, entre 2018 e 2019, no CPA-IAL para determinação de índices de performance diagnóstica do exame histopatológico na vigilância epidemiológica de febre amarela, avaliação da sensibilidade do exame imuno-histoquímico para amostras com autólise de moderada a avançada e comparação da mediana de tempo decorrido para emissão dos relatórios em cada período. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significante na performance da detecção de FA por histologia e IHQ entre os períodos pré e pós algoritmo; houve importante redução na quantidade de exames IHQ solicitados e no tempo de liberação dos relatórios ($p<0,0001$). **Conclusões:** O algoritmo resultou em desempenho semelhante, redução do tempo de liberação oportuno para a vigilância epidemiológica do agravo e da quantidade de reações IHQ realizadas, portanto, apresentando-se adequado para o diagnóstico de febre amarela em PNH no CPA-IAL.

Palavras-chave: Algoritmo, Vigilância, Febre Amarela, Primatas, Zoonose, Saúde Pública

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiana Brasil Eredosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Introdução

A febre amarela (FA) é uma doença hemorrágica zoonótica não contagiosa, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, endêmico em países tropicais dos continentes africano, central e sul-americano, já tendo atingido países como EUA, Espanha, França, Inglaterra e Itália^{1,2}. No Brasil, é agravo de importância em saúde pública.³

São conhecidos dois ciclos dessa arbovirose no território brasileiro: silvestre e urbano. Controlado desde 1942, no ciclo urbano ocorre a transmissão do vírus aos seres humanos pelo mosquito *Aedes aegypti*⁴; no silvestre, presente na atualidade, a transmissão envolve principalmente mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabathes*. No país os primatas não humanos (PNH) atuam na manutenção desse ciclo, por meio da amplificação do vírus.^{5,6}

São susceptíveis à doença os seres humanos e os PNH.³ Dessa forma, os primatas não humanos apresentam-se como grupo sentinel para a vigilância de epizootias de febre amarela, predizendo o risco para casos humanos.⁷ Observou-se que surtos silvestres da doença em PNH antecedem e acompanham a epizootia em humanos.^{8,4} Os primatas neotropicais compõem um grupo vasto de 174 espécies conhecidas (216 espécies/subespécies), das quais 42,1% estão ameaçadas.⁹ Em espécies com alta sensibilidade ao vírus, como ocorre com primatas do gênero *Alouatta*, em que surtos da doença afetaram gravemente populações de diferentes localidades, o monitoramento da circulação viral é importante, bem como a definição de estratégias para conservação das espécies ameaçadas pela doença.¹⁰

No Brasil, até 1999, a vigilância da FA era realizada apenas pela investigação de casos humanos. A partir de 2000, o Ministério da Saúde incorporou a vigilância do vírus em PNH ao Programa de Vigilância, Prevenção e Controle da Febre Amarela, por meio da investigação do adoecimento e óbito de primatas não humanos em território nacional. A investigação ocorre por meio da notificação de epizootias no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) por profissionais de saúde, seguida de coleta de material para diagnóstico laboratorial.^{5,11}

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) – vinculado à Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) – atua na vigilância laboratorial de FA em seres humanos e em PNH, por meio de provas sorológicas, análises anatomo-patológicas, imuno-histoquímicas (IHQ), moleculares (RT-qPCR e sequenciamento viral) e isolamento viral das amostras.¹² O seu Centro de Patologia (CPA), especificamente, executa o exame histopatológico em amostras de variados tecidos biológicos, como

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

fígado, baço, rim, coração, pulmão e cérebro, fixados em formalina, e os exames imuno-histoquímico e de RT-qPCR em amostras de fígado emblocadas em parafina. A análise histopatológica consiste na identificação de alterações teciduais em nível microscópico.^{13,14} O IHQ constitui uma ferramenta complementar a essa análise, cujo objetivo é a localização microscópica de antígenos específicos nos tecidos analisados, por meio de uma reação antígeno-anticorpo.¹⁵

Até o ano de 2018 todas as amostras de PNH preservadas em formalina encaminhadas ao CPA-IAL eram submetidas ao IHQ, independente dos achados histopatológicos. Embora seja uma ferramenta de grande importância diagnóstica, esse exame representa um custo adicional, sendo indicado como auxiliar confirmatório da histopatologia.

A epidemia recente de febre amarela no país possibilitou maior conhecimento sobre as lesões histológicas, padrão de imunomarcação, carga viral e susceptibilidade de grupos de primatas não humanos neotropicais. Em meio ao decreto de emergência pública, visando à agilidade na conclusão das investigações e rápida resposta pelo Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE/CCD/SES-SP), foi desenvolvido e implantado, em 2019, no CPA-IAL, um algoritmo diagnóstico para sistematização de exames imuno-histoquímicos, mantendo a eficiência diagnóstica no contexto da vigilância epidemiológica de FA em PNH.

Este trabalho objetiva avaliar a implantação desse algoritmo por meio da concordância entre resultado histopatológico e análise imuno-histoquímica, da determinação da performance dos exames e da avaliação do tempo mediano de liberação dos laudos, antes e após implantação do algoritmo.

Metodologia

Amostragem

Foram revisados os relatórios anatomo-patológicos de primatas não humanos emitidos pelo Sistema de Informação e Gestão Laboratorial entre junho de 2018, período anterior à implantação do algoritmo, e abril de 2019, momento em que o algoritmo foi aplicado à rotina de PNH recebida pelo Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz para pesquisa de FA, em conformidade com o Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela.

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Eredosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Para a análise da eficiência do algoritmo diagnóstico foi estabelecida seleção de 400 casos, sendo 200 relatórios referentes ao período anterior à sua implantação e 200 relatórios ao período posterior. Para atingir a meta proposta foram triados 546 relatórios anatomo-patológicos de PNH, com a exclusão de 146 casos. Os critérios definidos para a seleção dos casos para este estudo foram o envio obrigatório de fígado conservado em formalina 10% para análise histopatológica, com autólise de discreta à ausente, possibilitando a adequada avaliação morfológica das alterações microscópicas e a realização de exame de RT-qPCR em amostra de fígado fresco congelado.

Foram verificadas e analisadas as informações relativas ao gênero de primata não humano, caracterização histopatológica e imuno-histoquímica dos fragmentos de fígado representados, providos pelo Centro de Patologia, e os resultados de teste molecular por RT-qPCR, providos pelo Centro de Virologia, ambos do IAL.

Algoritmo

No período anterior à implantação do algoritmo diagnóstico para FA, todas as amostras de fígado de PNH recebidas no Centro de Patologia eram submetidas obrigatoriamente às análises histopatológica, para caracterização morfológica das alterações teciduais em nível microscópico e imuno-histoquímico, para pesquisa de antígenos do vírus amarílico nos tecidos, independente dos tipos de alterações encontradas pelo exame histopatológico. Apenas nos casos em que fragmentos de fígado não eram encaminhados, realizava-se o exame histopatológico dos tecidos enviados, mas o caso era considerado inadequado para pesquisa do vírus, não se procedendo à investigação imuno-histoquímica. O fluxo diagnóstico seguido nesse período está demonstrado da Figura 1.

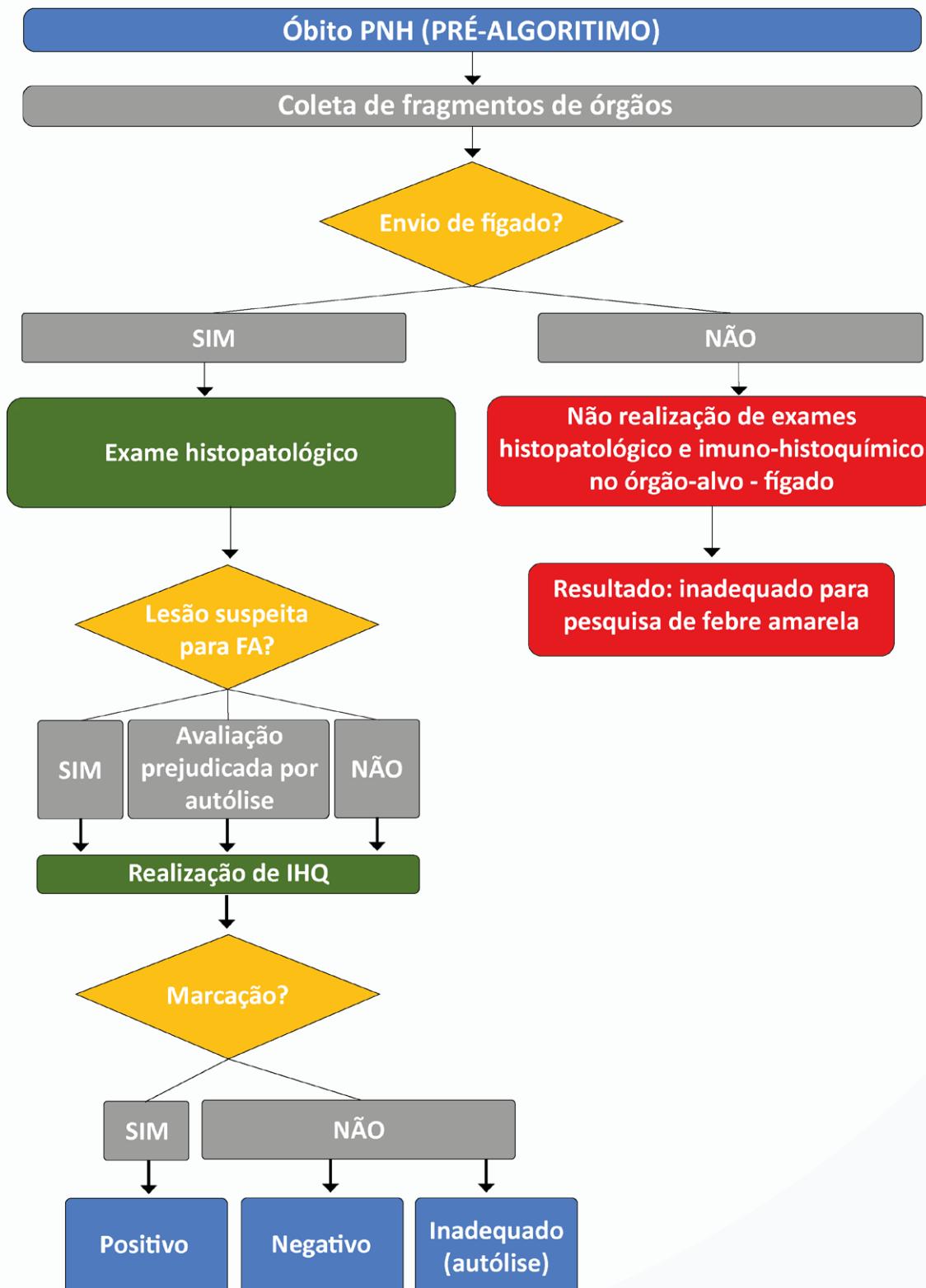
Por meio do algoritmo, as amostras de fígado passaram a ser triadas pelo padrão de alterações teciduais microscópicas. E aquelas que foram compreendidas pelo escopo de lesões causadas pelo vírus da febre amarela foram encaminhadas para pesquisa de antígenos do vírus por exame complementar imuno-histoquímico. A Tabela 1 ilustra os achados histopatológicos suspeitos.

Com a implantação do algoritmo, definiram-se quatro categorias para as amostras de primatas não humanos, as quais estão ilustradas na Figura 2.

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiane Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Figura 1. Fluxo diagnóstico de amostras de PNH para a vigilância de FA no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, em período anterior à implantação do algoritmo diagnóstico em 2019



Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Tabela 1. Lesões histológicas observadas em infecção pelo vírus da FA em PNH

	Achados histológicos suspeitos
Achados clássicos	Hepáticos: necrose/apoptose hepatocitária, mediozonal a panlobular maciça com presença de corpúsculos apoptóticos hipereosinofílicos (Councilman-Rocha Lima).
Achados frequentes	Hepáticos: escassez de infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear; esteatose macro e microgoticular, em especial a de padrão moruliforme. Baço: depleção linfoide.
Achados ocasionais	Hepáticos: hemorragia e hemossiderose. Rim: necrose tubular aguda, material proteináceo intratubular. Pulmão: hemorragia intra-alveolar.

Análise estatística

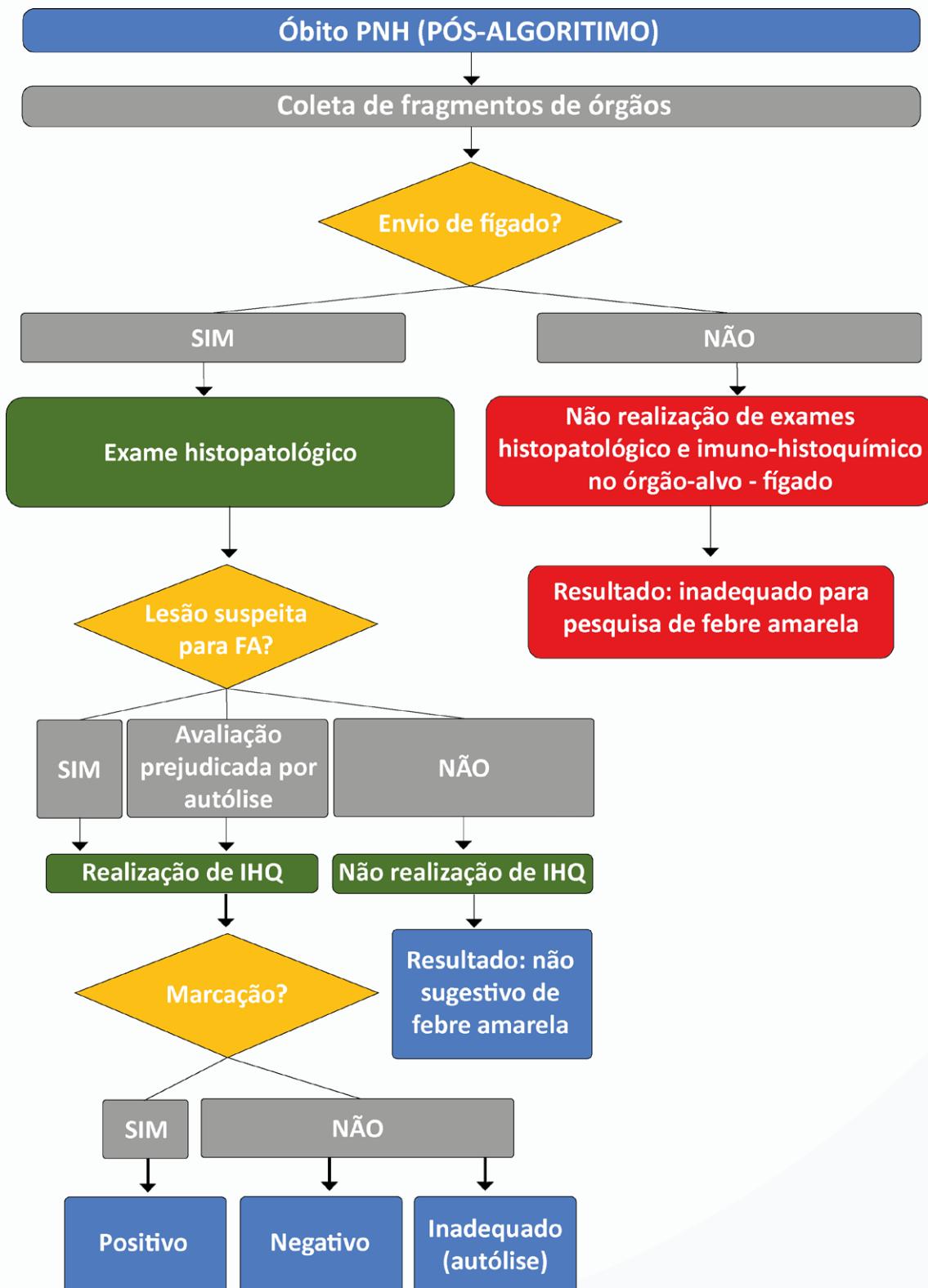
Os resultados dos exames histopatológicos, imuno-histoquímicos e de RT-qPCR das amostras frescas foram tabulados e analisados. Foram calculados os seguintes índices de performance: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do conjunto de análises laboratoriais utilizadas para pesquisa de febre amarela nos períodos pré e pós-algoritmo, por meio do programa MedCalc Software. Já o valor Kappa de concordância com o resultado molecular de RT-qPCR foi obtido pelo software GraphPad, San Diego, California (EUA), cujo resultado foi considerado como padrão-ouro. Para cálculo de performance e concordância foram considerados, no período pré-algoritmo: positivos os casos com IHQ positiva e negativos com IHQ negativa. No pós-algoritmo: positivos os casos com IHQ positiva e negativos os casos com histologia não sugestiva de febre amarela e casos com IHQ negativa.

Para o tempo necessário para a liberação dos resultados, calculou-se a significância estatística com base nas medianas de cada período, através do teste estatístico de Wilcoxon, pelo programa MedCalc Software.

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Eredosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Figura 2. Fluxo diagnóstico de FA em PNH após implantação de algoritmo em 2019 no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.



Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Eredosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Resultados

No período anterior à implantação do algoritmo diagnóstico para FA em PNH, as amostras analisadas foram representadas pelos seguintes gêneros: 77% (154/200) *Callithrix*, 9,5% (19/200) *Alouatta*, 5% (10/200) *Sapajus*, 0,5% (1/200) *Callicebus*; em 8% (16/200) o gênero não foi identificado.

Após a análise histopatológica, a investigação laboratorial de todos os casos foi complementada por exame imuno-histoquímico, com 4% (8/200) de resultados positivos para antígenos do vírus. O exame molecular de RT-qPCR foi positivo em 5% (10/200) dos casos. Houve excelente concordância entre os resultados dos exames histopatológico e imuno-histoquímico e o resultado de RT-qPCR ($\kappa = 0.884$, IC 95%: 0.724 a 1.000). Esse fluxo de investigação apresentou a seguinte performance: 80% de sensibilidade (IC 95%: 44.39% a 97.48%), 100% de especificidade (IC 95%: 98,08% a 100,00%), valor preditivo positivo (VPP) de 100%, valor preditivo negativo (VPN) de 98,96% (IC 95%: 96.49% a 99.70%) e acurácia de 99% (IC 95%: 96.43% a 99.88%).

No período posterior, em 2019, as amostras analisadas foram representadas pelos seguintes gêneros: 76% (152/200) *Callithrix*, 12,5% (25/200) *Alouatta*, 5% (10/200) *Sapajus*, 0,5% (1/200) *Callicebus* e 0,5% (1/200) *Ateles*; em 5,5% (11/200) o gênero não foi identificado. Nesse momento, 17% (34/200) dos casos apresentaram lesões suspeitas para febre amarela e foram encaminhados para exame imuno-histoquímico. Os demais casos (83%; 166/200) não apresentaram lesões suspeitas e foram concluídos.

Foram positivos para FA por imuno-histoquímica 8,8% (3/34) dos casos, enquanto o exame molecular de RT-qPCR, realizado em todas as amostras, foi positivo em 2% (4/200). Houve excelente concordância ($\kappa = 0.855$, IC 95%: 0.573 a 1.000) entre os resultados do conjunto de exames realizados e o resultado do exame molecular. Após o algoritmo, houve a seguinte performance: 75% de sensibilidade (IC 95%: 19.41% a 99.37%), 100% de especificidade (IC 95%: 98.14% a 100.00%), VPP de 100%, VPN de 99,49% (IC 95%: 97.29% a 99.91) e acurácia de 99,5% (IC 95%: 97.25% a 99.99). Os índices de performance do conjunto de análises laboratoriais utilizadas antes e depois da implantação do algoritmo está compilado na Tabela 2. A estimativa de prevalência da doença no período analisado se manteve constante.

O tempo de investigação laboratorial nos períodos anterior e posterior à implantação do algoritmo, desde a chegada da amostra na recepção do IAL até a liberação do resultado no Sistema Interno de Gerenciamento Hospitalar (SIGH), foi representado por mediana de 17 (de 5 a 52) e 13 dias (de 2 a 34), respectivamente ($p < 0,0001$).

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Eredosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

As amostras excluídas da análise do algoritmo foram representadas em 10,4% (57/546) de casos com moderado a marcante grau de autólise hepática, para os quais a análise imuno-histoquímica foi positiva em 3,5% (2/57), com confirmação por exame molecular. Os demais exames foram considerados inadequados e a análise molecular foi negativa.

Tabela 2. Performance do conjunto de análises laboratoriais utilizados antes e após a implantação do algoritmo

	Pré-algoritmo	Pós-algoritmo
Coeficiente de concordância Kappa das análises laboratoriais com o resultado RT-qPCR	$\kappa = 0.884$ (IC 95%: de 0.724 a 1.000)	$\kappa = 0.855$ (IC 95%: 0.573 a 1.000)
Sensibilidade	80% (IC 95%: 44.39% a 97.48%)	75% (IC 95%: 19.41% a 99.37%)
Especificidade	100% (IC 95%: 98.08% a 100.00%)	100% (IC 95%: 98.14% a 100.00%)
Valor preditivo positivo	100%	100%
Valor preditivo negativo	98,96% (IC 95%: 96.49% a 99.70%)	99,49% (IC 95%: 97.29% a 99.91%)
Acurácia	99% (IC 95%: 96.43% a 99.88%)	99,5% (IC 95%: 97.25% a 99.99%)
Mediana do tempo para liberação de laudos em dias*	17	13

* p< 0,0001.

Discussão

A vigilância de epizootias é um componente importante de programas de prevenção e controle de doenças de relevância para a saúde pública, sendo útil na detecção precoce e ação em tempo adequado, no monitoramento e na avaliação de intervenções.¹⁶ Sua adequada execução exige coleta constante e sistemática, análise, interpretação de dados e disseminação integrada dos resultados obtidos para agentes responsáveis pelas ações de prevenção e controle de doenças.^{17,18}

Em um programa de vigilância de doenças infecciosas, o exame histopatológico representa uma ferramenta valiosa, consistindo na avaliação microscópica da morfologia tecidual, o que permite a identificação de anormalidades. Dessa forma, caracteriza-se como exame de triagem, em que a identificação de padrões de injúria conduz ao diagnóstico

Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Eredosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

ou à determinação de suspeitas etiológicas.¹⁴ Para determinados agentes infecciosos, a confirmação de suspeitas pelo exame histopatológico necessita de complementação por outros testes, sendo os mais utilizados na rotina diagnóstica os exames imuno-histoquímicos e moleculares por PCR.^{13,14}

O Brasil apresenta uma diversidade de gêneros de primatas não humanos, dentre os quais há diferença na susceptibilidade à infecção pelo vírus da febre amarela e óbito por falência hepática aguda. O gênero *Alouatta* é o mais suscetível ao óbito por essa infecção viral, observando-se no exame histopatológico do fígado um espectro completo de lesões, como necrose e apoptose de hepatócitos, com presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, esteatose macro e microgoticular e hemorragia. Outros gêneros que também se apresentaram suscetíveis e desenvolveram lesões hepáticas similares foram *Callicebus* e *Sapajus*. O gênero *Callithrix* foi o grupo com maior amostragem no Instituto Adolfo Lutz durante o surto de FA de 2017. No entanto, foi o que apresentou menor proporção de casos positivos e menor carga viral, em comparação com o gênero *Alouatta*, além de ser o principal grupo com animais positivos discordantes, caracterizados pela detecção do vírus por PCR, porém com ausência de lesões histológicas e de detecção de antígeno viral por imuno-histoquímica no tecido hepático.¹²

A sensibilidade, tanto no período pré como no pós-algoritmo, pode ter sido afetada pela ocorrência de casos positivos discordantes. Por fim, no grupo excluído devido à autólise destacou-se a presença de casos com antígeno detectável, mostrando a importância da realização da IHQ em tecidos nessa condição.

Com os resultados obtidos, portanto, a implantação de um algoritmo diagnóstico para febre amarela em PNH no Centro de Patologia IAL demonstrou ser uma alternativa interessante por manter capacidade diagnóstica equiparável ao período anterior à sua implantação, ao mesmo tempo em que reduziu significativamente a quantidade de exames imuno-histoquímicos solicitados, o custo e o tempo dispendidos para conclusão da investigação laboratorial. Isso permitiu o redirecionamento de tempo e recursos para investigação de outras doenças de interesse em saúde pública e para a conservação da fauna silvestre, um aspecto importante no contexto de atuação em saúde. Para qualidade na aplicação do algoritmo, ressalta-se a importância de equipe multidisciplinar que inclua patologistas veterinários com conhecimento em patologia de animais selvagens, especialmente primatas não humanos.¹⁴

Conclusão

O algoritmo diagnóstico apresentou performance semelhante ao modelo previamente aplicado, mostrando-se apto para compor a rotina diagnóstica de febre amarela em PNH. Como benefícios, reduziu-se a quantidade de exames imuno-histoquímicos solicitados e o tempo de liberação de relatórios de investigação para que a vigilância epidemiológica da CCD/SES-SP possa realizar as ações preventivas e de controle deste agravo em tempo oportuno.

Referências

1. Franco O, organizador. A história da febre amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969.
2. Bonadio, G. O pioneirismo brasileiro no combate à febre amarela. ASBRAP. 1997;4:59-69.
3. Vasconcelos, PFC. Febre amarela (yellow fever). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003;36(2):275-93.
4. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. RPAS. 2011;55(61), 11-26.
5. Ministério da Saúde. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. Brasília (DF); 2017.
6. Pan American Health Organization. Control of yellow fever - field Guide. Washington; 2005.
7. Almeida MAB, Cardoso JC, dos Santos E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJC, et al. Surveillance for yellow fever virus in non-human primates in Southern Brazil, 2001-2011: a tool for prioritizing human populations for vaccination. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014; 8(3):1-7.
8. Moreno ES, Spinola R, Tengan CH, Brasil RA, Siciliano MM, Coimbra TLM, et al. Epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2013; 55(1), 45-50.
9. The International Union for Conservation of Nature. Global primate biodiversity [internet]. Washington (DC); 2022, 1 Apr. [acesso em 15 jul 2021]. Disponível em: http://www.primate-sg.org/primate_diversity_by_region/

10. Fialho MS, Printes RC, Almeida MAB, Laroque PO, Santos E, Jerusalinsky L. Avaliação do impacto da epizootia de febre amarela sobre as populações de primatas não humanos nas unidades de conservação do Rio Grande do Sul, Brasil. Biotemas. 2012; 25(3):217-25.
11. Secretaria de Estado da Saúde (SC). Programa de Vigilância e Controle da Febre Amarela em Santa Catarina. Florianópolis (SC); 2020.
12. Fernandes NCCA, Guerra JM, Díaz-Delgado J, Cunha MS, Saad LC, Iglesias SD, et al. Differential yellow fever susceptibility in new world nonhuman primates, comparison with humans, and implications for surveillance. Emerg Infect Dis. 2021;27(1):47-56.
13. Gupta E, Bhalla P, Khurana N, Singh T. Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. Indian J Med Microbiol. 2009;27(2):100-6.
14. Santos ALM, Nagamori FO, Jesus IP, Ferreira CSS., Nascimento PM, Silva SA, et al. Estudo descritivo: histopatologia e imuno-histoquímica para a detecção de patógenos em amostras de fauna selvagem recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Brasil [internet]. BEPA. 2021;18:1-12. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicoes-2021/edicao_205-_janeiro.pdf
15. Cartun RW, Taylor CR, Dabbs DJ. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry – Theranostic and genomic applications. Philadelphia (EUA): Elsevier; 2019. p 1-2.
16. Thacker SB. Surveillance. In: Gregg MB, organizador. Field epidemiology. 2º ed. New York: Oxford University Press; 2002. p 26-50.
17. Nsubuga P, White ME, Thacker SB, Anderson MA, Blount SB, Broome CV et al. Public health surveillance: a tool for targeting and monitoring interventions. In: Jamilson DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB et al., editors. Disease control priorities in developing countries. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development/New York: Oxford University Press; 2006. p 997. Chapter 53.
18. Thacker S, Berkelman R. Public health surveillance in the United States. Epidemiol Rev. 1998;10:164-90.

HISTÓRICO

Recebimento
30/06/2022

Aprovação
19/07/2022

Publicação
19/07/2022



Análise de algoritmo diagnóstico de febre amarela em amostras de primatas não humanos encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Ticiania Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo, Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Original Article

Assessment of a diagnostic algorithm for yellow fever in non-human primate samples referred to the Pathology Center at the Adolfo Lutz Institute

Ticiana Brasil Ervedosa^[1], Pedro Enrique Navas-Suárez^[1,2], Eduardo Ferreira Machado^[1,2], Rodrigo Albergaria Ressio^[1], Cinthya dos Santos Cirqueira^[1], Isis Paixão de Jesus^[1], Julia de Carvalho^[1], Ketlyn Bolsachini Figueiredo^[3], Mariana Sequentin Cunha^[4], Leila del Castillo Saad^[5], Tatiana Lang D'Agostini^[5], Roberta Fernandes Spinola^[5], Juliana Mariotti Guerra^[3], Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes^[1,2]

1. Department of Anatomical Pathology, Pathology Center, Adolfo Lutz Institute, Disease Control Coordination. São Paulo State Health Department. São Paulo, SP, Brazil
2. Wildlife Comparative Pathology Laboratory, Pathology Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
3. Quantitative Pathology Department, Pathology Center, Adolfo Lutz Institute, Disease Control Coordination. São Paulo State Health Department. São Paulo, SP, Brazil
4. Department of Vectorial Transmission Diseases, Virology Center, Adolfo Lutz Institute, Disease Control Coordination. São Paulo State Health Department. São Paulo, SP, Brazil
5. “Prof. Alexandre Vranjac” Center for Epidemiological Surveillance, Disease Control Coordination. São Paulo State Health Department. São Paulo, SP, Brazil

Mailing

Natália C. C. de A. Fernandes
E-mail: patologia.animal@ial.sp.gov.br
Institution: Instituto Adolfo Lutz | Centro de Patologia Núcleo de Anatomia Patológica
Address: Av. Doutor Arnaldo, nº 355, 7º andar. CEP: 01246-000. São Paulo/SP

Assessment of a diagnosis algorithm for yellow fever
in non-human primate samples referred to the Pathology Center at the Adolfo Lutz Institute

Ticiana Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo,
Mariana Sequentin, Tatiana Lang D'Agostini et al.

Abstract

The Brazilian Health Department accredits the Pathology Center at the Adolfo Lutz Institute (CPA-IAL) as a macro-regional reference laboratory for yellow fever (YF) epidemiological surveillance in humans and non-human primates (NHP) in Brazil. CPA-IAL performs histopathological and immunohistochemical (IHC) analysis. Until 2018, all NHP samples for YF research were tested in both. In 2019, they implemented a screening-based diagnostic algorithm using histopathological features seen in liver tissue samples, thus carrying out more rationalized IHC tests. **Objective:** Assess the use of the diagnostic algorithm compared with the period before it was implemented. **Methods:** Retrospective study of NHP anatomopathology reports issued from 2018 to 2019 at CPA-IAL, in order to establish diagnosis performance indices of the histopathological test for YF epidemiological surveillance; to perform a sensitivity analysis of immunohistochemical test for samples with moderate to intense autolysis; and to compare the median time required for releasing reports for each period. **Results:** There was no statistically significant difference in histology and IHC performance for detecting YF between the pre and post-algorithm periods; there was an important reduction in the number of requested IHC tests, as well as in the time span for releasing reports ($p <0.0001$). **Conclusions:** The algorithm showed similar performance, resulting in reduced due time for its releasing to epidemiologic surveillance, and in a reduced number of IHC reactions, therefore being proper for diagnosing yellow fever in NHP at CPA-IAL.

Keywords: Algorithm, Surveillance, Yellow Fever, Primates, Zoonosis, Public Health

Introduction

The yellow fever (YF) is a zoonotic, hemorrhagic, not contagious disease caused by an arbovirus of the *Flavivirus* genus, which is endemic in African, Central-American, and South-American tropical countries. It has already spread throughout countries like USA, Spain, France, England, and Italy^{1,2}. In Brazil, it is a significant public health affliction.³

Two cycles of that arbovirus are known in the Brazilian territory: sylvatic and urban. In the urban cycle, which has been controlled since 1942, the virus transmission to humans happens through the *Aedes aegypti*⁴ mosquito; in the current sylvatic, or jungle cycle, dissemination involves mainly mosquitoes of the *Haemagogus* and *Sabathes* genera. In Brazil, non-human primates (NHP) sustain the sylvatic cycle by amplifying the virus.^{5,6}

Both humans and NHP are susceptible to the disease.³ Therefore, non-human primates are a sentinel group for yellow fever epizootic surveillance, anticipating risk to human cases.⁷ Sylvatic yellow fever outbreaks have been noticed to precede and follow human epizootics.^{8,4} Neotropical primates comprise a broad group of 174 known species (216 species/subspecies), 42.1% of which are under threat.⁹ In highly sensitive species to the virus, such as primates of the *Alouatta* genus—whose populations in different locations are severely affected by YF outbreaks—, monitoring the viral dissemination is vital, as well as drawing up strategies to conserve threatened species.¹⁰

Until 1999, Brazilian YF surveillance only studied human cases. Since 2000, the Brazilian Department of Health has incorporated the surveillance of the virus in NHP into the Yellow Fever Surveillance, Prevention and Control Program, by researching illness and deaths in non-human primates throughout the country. Health professionals conduct such research using data from epizootic reports in the Information System for Aggravation Notification (Sinan), followed by material collecting for laboratorial diagnosis.^{5,11}

The Adolfo Lutz Institute (IAL)—linked to the Disease Control Coordination, in the São Paulo State Health Department (CCD/SES-SP)—works with laboratorial surveillance of YF in both humans and NHP, using serological tests; anatomopathological, immunohistochemical (IHC), and molecular (RT-qPCR and viral sequencing) analyses; and viral isolation of samples. Their Pathology Center (CPA) performs histopathological tests on formalin-fixed samples of various biologic tissues—liver, spleen, kidney, heart, lung, and brain—, as well as IHC and RT-qPCR tests on paraffin-embedded liver samples. Histopathological analysis consists in identifying tissue changes at microscopic levels.^{13,14} IHC is a complementary test to that analysis, whose objective is to microscopically locate specific antigens in the examined tissue samples through an antigen-antibody reaction.¹⁵

Until 2018, all formalin-preserved NHP samples sent to CPA-IAL were submitted to IHC, no matter the histopathological findings. Despite its being an extremely important diagnosis tool, the IHC test incurs additional cost, hence the reason it is recommended as a confirmatory histopathology test.

The recent yellow fever epidemic in Brazil has broadened the knowledge of histological lesions, immunolabeling standardization, viral load, and susceptibility of Neotropical non-human primate groups. With the public contingency plan aiming for rapid completion of the studies and a quick response from the “Prof. Alexandre Vranjac” Center for Epidemiological Surveillance (CVE/CCD/SES-SP), CPA-IAL have developed and implemented, in 2019, a diagnostic algorithm for systematizing immunohistochemical tests, promoting diagnosis efficiency in the context of epidemiological surveillance of YF in NHP.

This paper aims to evaluate the implementation of that algorithm by confirming accordance between histopathological results and immunohistochemical analysis; by ascertaining the performance of the tests; and by assessing the median time for releasing reports before and after the algorithm was implemented.

Methodology

Sampling

We have reviewed the non-human primate anatomopathology reports issued by the Laboratory Information Management System between June 2018–prior to the implementation of the algorithm—and April 2019—when the Pathology Center at the Adolfo Lutz Institute started using the algorithm in their NHP routine for YF research, in accordance with the National Program for Yellow Fever Epidemiological Surveillance.

In order to evaluate the efficiency of the diagnostic algorithm, we have selected 400 cases: 200 reports prior to its implementation, and 200 reports from the subsequent period. To achieve the proposed goal, we have screened 546 NHP anatomopathology reports, excluding 146 cases. The chosen criteria for selecting cases for this study were the mandatory submission of 10% formalin-preserved liver for histopathological analysis,

with mild to absent autolysis, allowing proper morphological assessment of microscopic changes; and RT-qPCR testing on fresh frozen liver samples.

We have verified and analyzed the information regarding the non-human primate genera, the histopathological and immunohistochemical descriptions of liver fragments provided by the Pathology Center at IAL, and the results of RT-qPCR molecular testing provided by the Virology Center at IAL.

Algorithm

Prior to the implementation of the diagnostic algorithm for YF, all PNH liver samples referred to the Pathology Center were necessarily submitted to histopathological analysis, to morphologic description of tissue changes at both microscopic and immunohistochemical levels, and to research into yellow fever virus antigens in tissues, regardless of what kind of changes were found in the histopathological test. Only when liver fragments were not referred, the tissue samples were histopathologically tested; but such cases were considered improper for virus research, and not submitted to immunohistochemical studies. Figure 1 illustrates the diagnosis flow we followed in that period.

With the algorithm, the liver samples started to be screened using the pattern of microscopic tissue changes. The ones included in the scope of lesions caused by the yellow fever virus were referred to virus antigen research by ancillary immunohistochemical test. Table 1 shows the suspicious histopathological findings.

With the implementation of the algorithm, four categories were established for the non-human primate samples. Figure 2 illustrates them.

Figure 1. Diagnosis flow of NHP samples for YF surveillance in the Pathology Center at Adolfo Lutz Institute, in the period prior to the implementation of the diagnostic algorithm, in 2019

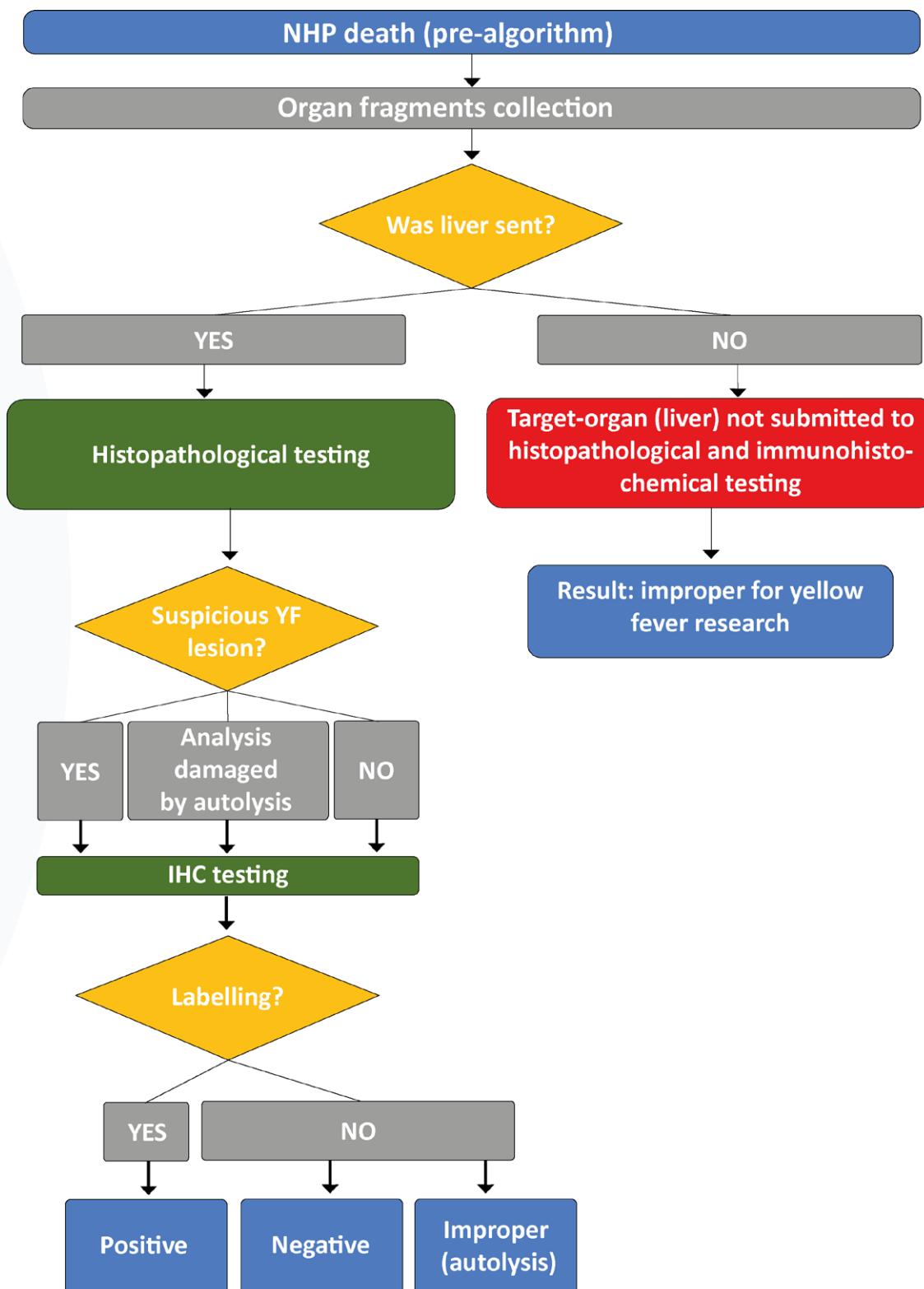


Table 1. Histological lesions seen in YF virus infection in NHP

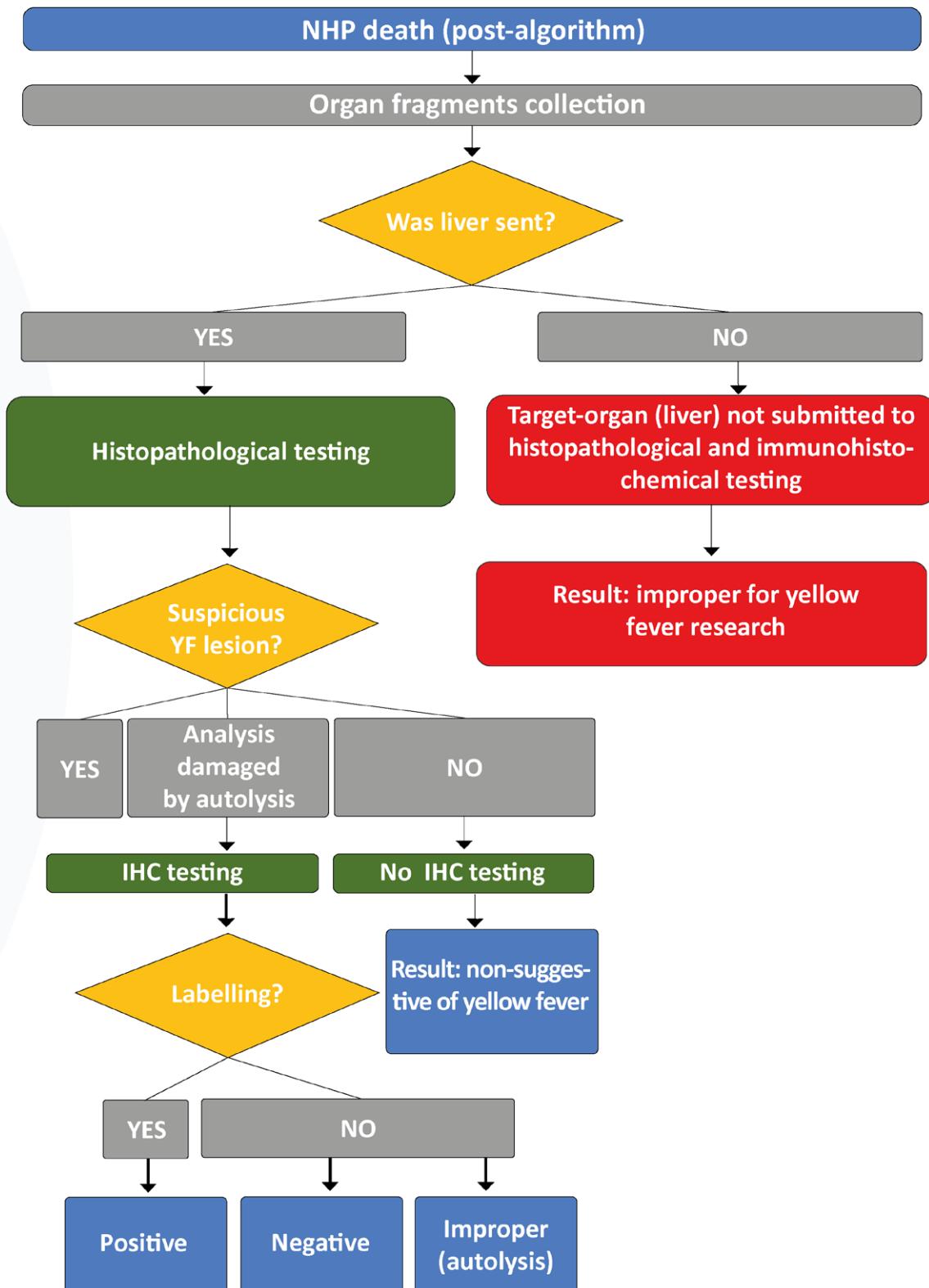
	Suspicious histological findings
Classic findings	Hepatic: massive midzonal to panlobular hepatocyte necrosis/apoptosis, with presence of hyper-eosinophilic apoptotic corpuscles (Councilman-Rocha Lima).
Frequent findings	Hepatic: scarce, predominantly mononuclear inflammatory infiltrate; macro and microcytic steatosis, especially the morula-form pattern one. Spleen: lymphoid depletion.
Occasional findings	Hepatic: hemorrhage and hemosiderosis. Kidney: acute tubular necrosis, intratubular proteinaceous material. Lung: intra-alveolar hemorrhage

Statistical analysis

We have tabulated and analyzed the results from the histopathological, immunohistochemical, and RT-qPCR tests on fresh samples. We have calculated the following performance indices: sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy of the laboratory tests used to research yellow fever in the pre and post-algorithm periods, using the MedCalc Software. We have calculated the Kappa value of accordance with the RT-qPCR molecular result using the software GraphPad, San Diego, California (USA), whose result was considered as gold standard. To calculate performance and accordance, we have considered, in the pre-algorithm period: as positive, the cases with positive IHC; and negative, the cases with negative IHC. In the post-algorithm period: positive, the cases with positive IHC; and negative, the cases with non-suggestive histology of yellow fever, and the cases with negative IHC.

To measure the due time for releasing the results, we have calculated the statistical significance based on the median time of each period, using the Wilcoxon statistical test, with the MedCalc software.

Figure 2. YF diagnosis flow in NHP after the implementation of the algorithm, in 2019, in the Pathology Center at Adolfo Lutz Institute



Results

In the period prior to the implementation of the diagnostic algorithm for YF in NHP, the analyzed samples represented the following genera: 77% (154/200) *Callithrix*; 9.5% (19/200) *Alouatta*; 5% (10/200) *Sapajus*; 0.5% (1/200) *Callicebus*; and 8% (16/200) non-classified genus.

After histopathological analysis, immunohistochemical testing complemented the laboratorial studies of all cases, with 4% (8/200) positive results for virus antigens. RT-qPCR molecular testing was positive in 5% (10/200) cases. There was excellent accordance between the results from histopathological and immunohistochemical tests, and the results from RT-qPCR ($\kappa = 0.884$, CI 95%: 0.724 to 1.000). Such a study flow showed the following performance: 80% sensitivity (CI 95%: 44.39% to 97.48%); 100% specificity (CI 95%: 98.08% to 100.00%); 100% positive predictive value (PPV); 98.96% negative predictive value (NPV) (CI 95%: 96.49% to 99.70%); and 99% accuracy (CI 95%: 96.43% to 99.88%).

In the period subsequent to the algorithm, in 2019, the analyzed samples represented the following genera: 76% (152/200) *Callithrix*; 12.5% (25/200) *Alouatta*; 5% (10/200) *Sapajus*; 0.5% (1/200) *Callicebus*; 0.5% (1/200) *Ateles*; and 5.5% (11/200) non-classified genus. At that time, 17% (34/200) cases showed suspicious yellow fever lesions, and were referred to immunohistochemical testing. The remaining cases (83%; 166/200) had no suspicious lesions, and were concluded.

Out of the cases using immunohistochemistry, 8.8% (3/34) tested positive for YF, while 2% (4/200) were positive in the RT-qPCR molecular test, which was applied in all samples. There was excellent accordance ($\kappa = 0.855$, CI 95%: 0.573 to 1.000) between the results from all tests and the results from the molecular test. After the algorithm, there was the following performance: 75% sensitivity (CI 95%: 19.41% to 99.37%); 100% specificity (CI 95%: 98.14% to 100.00%), 100% PPV; 99.49% NPV (CI 95%: 97.29% to 99.91); and 99.5% accuracy (IC 95%: 97.25% to 99.99). Table 2 compiles the performance indices of the set of laboratorial analysis used before and after the implementation of the algorithm. The estimated prevalence of the disease in the studied period remained constant.

The time of laboratorial research in the periods prior and subsequent to the implementation of the algorithm—from the sample arriving at IAL to the releasing of its result in the Internal Hospital Management System (SIGH)—was represented by a median of 17 (from 5 to 52) and 13 (from 2 to 34), respectively ($p < 0.0001$).

Samples excluded from the algorithm analysis represented 10.4% (57/546) cases with moderate to intense hepatic autolysis degree, out of which 3.5% (2/57) tested positive in immunohistochemical analysis, confirmed by molecular testing. The other tests were considered improper, and the molecular analysis was negative.

Tabela 2. Performance do conjunto de análises laboratoriais utilizados antes e após a implantação do algoritmo

	Pre-algorithm	Post- algorithm
Kappa accordance coefficient of laboratorial analysis with RT-qPCR result	$\kappa = 0.884$ (IC 95%: de 0.724 to 1.000)	$\kappa = 0.855$ (IC 95%: 0.573 a 1.000)
Sensitivity	80% (IC 95%: 44.39% a 97.48%)	75% (IC 95%: 19.41% a 99.37%)
Specificity	100% (IC 95%: 98.08% a 100.00%)	100% (IC 95%: 98.14% a 100.00%)
Positive predictive value	100%	100%
Negative predictive value	98.96% (IC 95%: 96.49% a 99.70%)	99.49% (IC 95%: 97.29% a 99.91%)
Accuracy	99% (IC 95%: 96.43% a 99.88%)	99,5% (IC 95%: 97.25% a 99.99%)
Median time for releasing reports, in days *	17	13

* $p < 0.0001$.

Discussion

Epizootic surveillance is a significant factor in prevention and control plans for diseases of public health relevance. It is useful to early detection and timely action, as well as in monitoring and evaluating interventions.¹⁶ Carrying out a proper surveillance demands constant and systematic collection, assessment, data interpretation, and integrated dissemination of the achieved results to officers responsible for disease prevention and control measures.^{17,18}

The histopathological test is a valuable tool for infectious disease surveillance programs. It consists in the microscopic analysis of tissue morphology, allowing the identification of abnormalities. Therefore, it is considered a screening test; the identification of injury patterns leads to the diagnosis, or to the ascertainment of etiological suspicions.¹⁴ For certain infectious agents, suspicions confirmed by histopathological test need to be complemented by other analysis; immunohistochemical and PCR molecular tests are mostly frequent in diagnostic routines.^{13,14}

Brazil has a great diversity of non-human primate genera, amongst which there are different susceptibilities to YF virus infection, and to death from acute liver failure. The *Alouatta* genus is the most susceptible to death by such a viral infection; histopathological testing on livers has shown a wide range of lesions, such as hepatocyte necrosis and apoptosis with presence of Councilman-Rocha Lima corpuscles, macro and microcytic steatosis, and hemorrhage. The *Callicebus* and *Sapajus* genera are also susceptible, having developed similar hepatic lesions. The *Callithrix* genus was the largest sampling group at the Adolfo Lutz Institute during the 2017 yellow fever outbreak. However, that group presented the lowest proportion of positive cases and the lowest viral load when compared with the *Alouatta* genus. It was also the main group with positive discordant animals – they were defined as positive by PCR virus detection, but had no histological lesions and no detected viral antigen by immunohistochemistry in liver tissues.¹²

The sensitivity, both pre and post-algorithm, may have been influenced by the occurrence of positive discordant cases. Finally, in the group excluded due to autolysis, there were cases with detectable antigen, demonstrating the importance of IHC testing on tissues under those conditions.

With the achieved results, therefore, the diagnostic algorithm for yellow fever in NHP in the Pathology Center at IAL has revealed itself as an interesting diagnosis alternative, as it keeps equivalent diagnosis ability to the period prior to its implementation, while reducing significantly the number of required immunohistochemical tests, the costs and the due time for laboratorial research completion. That fact has allowed time and resources to be relocated for studies on other diseases of public health interest, and for conserving wildlife, which is a significant aspect in the context of health work. For a better quality in using the algorithm, we reinforce the importance of a multidisciplinary team including veterinary pathologists with know-how in wildlife pathology, especially non-human primates.¹⁴

Conclusion

The diagnostic algorithm has shown similar performance to the previously used model, being suitable to the diagnosis routine of yellow fever in NHP. Additional benefits were a reduced number of required immunohistochemical tests, and a shorter time span for releasing research reports so that the CCD/SES-SP's epidemiological surveillance can perform prevention and control measures in a due time.

References

1. Franco O, organizador. A história da febre amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969.
2. Bonadio, G. O pioneirismo brasileiro no combate à febre amarela. ASBRAP. 1997;4:59-69.
3. Vasconcelos, PFC. Febre amarela (yellow fever). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003;36(2):275-93.
4. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. RPAS. 2011;55(61), 11-26.
5. Ministério da Saúde. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. Brasília (DF); 2017.
6. Pan American Health Organization. Control of yellow fever - field Guide. Washington; 2005.
7. Almeida MAB, Cardoso JC, dos Santos E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJC, et al. Surveillance for yellow fever virus in non-human primates in Southern Brazil, 2001-2011: a tool for prioritizing human populations for vaccination. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014; 8(3):1-7.
8. Moreno ES, Spinola R, Tengan CH, Brasil RA, Siciliano MM, Coimbra TLM, et al. Epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2013; 55(1), 45-50.
9. The International Union for Conservation of Nature. Global primate biodiversity [internet]. Washington (DC); 2022, 1 Apr. [acesso em 15 jul 2021]. Disponível em: http://www.primate-sg.org/primate_diversity_by_region/
10. Fialho MS, Printes RC, Almeida MAB, Laroque PO, Santos E, Jerusalinsky L. Avaliação do impacto

- da epizootia de febre amarela sobre as populações de primatas não humanos nas unidades de conservação do Rio Grande do Sul, Brasil. Biotemas. 2012; 25(3):217-25.
11. Secretaria de Estado da Saúde (SC). Programa de Vigilância e Controle da Febre Amarela em Santa Catarina. Florianópolis (SC); 2020.
 12. Fernandes NCCA, Guerra JM, Díaz-Delgado J, Cunha MS, Saad LC, Iglezias SD, et al. Differential yellow fever susceptibility in new world nonhuman primates, comparison with humans, and implications for surveillance. Emerg Infect Dis. 2021;27(1):47-56.
 13. Gupta E, Bhalla P, Khurana N, Singh T. Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. Indian J Med Microbiol. 2009;27(2):100-6.
 14. Santos ALM, Nagamori FO, Jesus IP, Ferreira CSS., Nascimento PM, Silva SA, et al. Estudo descritivo: histopatologia e imuno-histoquímica para a detecção de patógenos em amostras de fauna selvagem recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Brasil [internet]. BEPA. 2021;18:1-12. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicoes-2021/edicao_205-_janeiro.pdf
 15. Cartun RW, Taylor CR, Dabbs DJ. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry – Theranostic and genomic applications. Philadelphia (EUA): Elsevier; 2019. p 1-2.
 16. Thacker SB. Surveillance. In: Gregg MB, organizador. Field epidemiology. 2º ed. New York: Oxford University Press; 2002. p 26-50.
 17. Nsubuga P, White ME, Thacker SB, Anderson MA, Blount SB, Broome CV et al. Public health surveillance: a tool for targeting and monitoring interventions. In: Jamilson DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB et al., editors. Disease control priorities in developing countries. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development/New York: Oxford University Press; 2006. p 997. Chapter 53.
 18. Thacker S, Berkelman R. Public health surveillance in the United States. Epidemiol Rev. 1998;10:164-90.

HISTORIC

Received
30/06/2022

Approved
19/07/2022

Publication
19/07/2022



Assessment of a diagnosis algorithm for yellow fever
in non-human primate samples referred to the Pathology Center at the Adolfo Lutz Institute
Ticiana Brasil Ervedosa, Pedro Enrique Navas-Suárez, Eduardo Ferreira Machado, Ketlyn Bolsachini Figueiredo,
Mariana Sequetin, Tatiana Lang D'Agostini et al.