

Artigo original

Diagnóstico de febre amarela em tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina de primatas não humanos: a importância do exame histopatológico

Yellow Fever diagnosis in formalin fixed and paraffin embedded non-human primates' tissues: the importance of the histopathological examination

Natália C. C. de A. Fernandes¹, Juliana M. Guerra¹, Rodrigo A. Ressio¹, Cinthya Cirqueira Borges¹, Silvia D'Andretta Iglezias¹, Cristina T. Kanamura¹, Josué Díaz Delgado^{II}, Patricia Sousa Gonçalves¹, Marcelo Sansone¹, Filipe Onishi Nagamori¹, Isis Paixão de Jesus Rizkallah¹, Mariane Ingara de Moraes Costa¹, Simone Guimarães de Jesus¹, Silvana Mello¹, Júlia de Carvalho¹, Rosângela Araujo¹, Magda Almeida Montalvão¹, Rosemeire Oliveira Lima Rodrigues¹, Leonardo José Tadeu Araújo¹, Sônia Maria Pereira de Oliveira¹ e José Luiz Catão Dias^{II}.

¹Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde. ^{II}Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Os casos de óbitos ou convalescência de primatas não-humanos (PNH) por febre amarela (epizootias) apontam a circulação do vírus em uma determinada região e podem anteceder a ocorrência dessa doença em humanos. Portanto, o diagnóstico adequado desta enfermidade nos diferentes gêneros de PNH presentes no Brasil é importante para adoção de medidas estratégicas de controle da FA, como a vacinação. O Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (CPA-IAL), laboratório de referência macrorregional, participa do Programa de Vigilância de Epizootias em PNH do Ministério da Saúde, por meio da realização de exames histopatológico e imuno-histoquímico para FA. Este trabalho apresenta a casuística recebida e analisada no CPA-IAL durante o ano de 2017. Foram avaliadas amostras de 2.171 PNH, com resultado de 626 positivas no exame imuno-histoquímico do fígado (28,83%). Destas, o estado de preservação foi satisfatório em 580 e insatisfatório devido à autólise em 132. Das satisfatórias, 577 (99,48%) exibiram alterações histopatológicas típicas de FA no fígado, incluindo necrose/apoptose maciça com presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, degeneração goticular e escasso infiltrado inflamatório. Das insatisfatórias, 34,85% foram positivas. A concordância entre histopatologia e IHQ foi muito boa ($\kappa=0,98$). Os achados histológicos hepáticos de FA são conclusivos e podem servir como método de triagem para realização da imuno-histoquímica, sendo essas ferramentas diagnósticas essenciais para o diagnóstico e monitoramento da doença, mesmo em casos de autólise tecidual.

PALAVRAS-CHAVE: Arboviroses. Diagnóstico. Flavivirus. Histologia. Zoonoses.

ABSTRACT

Epizootics of Yellow Fever in non-human primates (NHP) are indicative of viral circulation of the Yellow Fever virus (YFV) and may predict the occurrence of human cases. Therefore, adequate diagnosis of the disease in the different genera of NHP occurring in Brazil is important for YF control strategies, such as vaccination. The Pathology Center of the Adolfo Lutz Institute (CPA-IAL), a macro-regional reference laboratory, participates in the Epizootic Surveillance Program through histopathological and immunohistochemical exams for YF. This study presents the caseload received and analyzed at the CPA-IAL during 2017, with especial emphasis on YF immunopositivity in the liver. Samples from 2,171 NHPs were evaluated in 2017. From these, 626 (28.83%) were positive by immunohistochemistry; 580 were well preserved and 132 were autolyzed. Of those well preserved, 577 (99.48%) exhibited typical YF histopathological changes in the liver, including massive necrosis/apoptosis with Councilman-Rocha Lima bodies, steatosis and mild inflammatory infiltrate. Histopathology and IHQ agreement was very good ($\kappa = 0,98$). Anatomopathological tools are pivotal for the diagnosis and monitoring of YF in NHP and may prove of great value even in carcasses with advanced autolysis. The YF-associated histopathological findings in liver of NHP are conclusive and should precede immunohistochemical screening method.

KEYWORDS: Arboviroses. Diagnostic. Flavivirus. Histology. Zoonosis.

INTRODUÇÃO

Ocorre no Brasil, desde o final de 2016, um aumento importante na circulação do vírus da febre amarela (FA), com avanço da doença na região Sudeste do país em áreas sem circulação viral nos últimos 100 anos, incluindo os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.¹ No Estado de São Paulo, foram registrados, no período de janeiro a outubro de 2017, 52 casos de FA silvestre em humanos, 23 deles autóctones, e 1.440 epizootias, com um total de 1.625 primatas não humanos (PNH) doentes ou mortos.²

A FA é uma doença viral não contagiosa, zoonótica, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, transmitida por inseto artrópode e mantida em ciclos silvestre e urbano.^{3,4} A existência de ciclo silvático

de FA com papel de PNH na sua manutenção foi descrita na década de 30.⁵ Alguns gêneros de PNH, como *Alouatta*, são extremamente susceptíveis a doença, com altas taxas de letalidade.⁶ Devido a esta susceptibilidade, foi estabelecido o programa de vigilância passiva de epizootias de PNH como evento sentinela de risco para Saúde Pública, conforme consta na portaria MS/GM nº 104 de 25 de janeiro de 2011.⁷ A presença de óbitos de PNH por FA sinaliza a circulação do vírus e auxilia no estabelecimento de medidas ativas para prevenir a doença no homem, como imunização, educação da população e eliminação de vetor. A morte dos animais representa um alerta para as autoridades de Saúde Pública, ativando ações que tentam impedir a reurbanização da doença,

uma vez que o ciclo silvestre não é passível de eliminação.⁸

A confirmação da epizootia por FA pode ser realizada por vínculo epidemiológico, quando associada à detecção viral em vetores, PNH ou em humanos no local provável de infecção, ou laboratorialmente. A confirmação por laboratório ocorre quando há resultado conclusivo de FA em pelo menos um PNH envolvido na epizootia.⁷

O diagnóstico conclusivo de FA é realizado por diferentes métodos: detecção do RNA viral, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase reversa quantitativa (RT-qPCR) e/ou detecção do antígeno viral em tecidos parafinados por imuno-histoquímica (IHQ),⁷ notadamente o fígado. No entanto, as lesões decorrentes da infecção por FA por meio do exame histopatológico do fígado corado em (Hematoxilina & Eosina) H&E podem sugerir a presença da doença.

A RT-qPCR pode ser realizada em amostras de sangue colhidas de animais doentes ou de sangue e/ou vísceras de PNH mortos. É exigida a colheita com assepsia, conservação imediata da amostra em gelo seco ou nitrogênio líquido e transporte rápido para o laboratório de referência, ou congelamento em freezer -70°C.⁷ Os exames histopatológico e imuno-histoquímico são realizados em amostras de vísceras de animais mortos fixadas em formalina e emblocadas em parafina. A fixação da amostra tem como objetivo a manutenção das características morfológicas teciduais com prevenção da autólise e da proliferação de microorganismos que promovem a putrefação⁹ e a solução de formalina 10% é a mais frequentemente utilizada para o diagnóstico anátomo-patológico.¹⁰ As amostras para o

diagnóstico de FA devem ser colhidas em até 48 horas após o óbito do animal e, uma vez fixadas, mantidas e transportadas à temperatura ambiente, obrigatoriamente com representação do fígado, órgão alvo para detecção do vírus. Não é necessário que os instrumentos de colheita ou frascos sejam estéreis.

Este trabalho tem como objetivo apresentar a casuística de PNH recebidos no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz durante o ano de 2017 (CPA-IAL) e os resultados obtidos nos exames histopatológicos e imuno-histoquímicos, demonstrando a utilização das ferramentas anátomo-patológicas na vigilância de FA num laboratório de patologia de Saúde Pública.

METODOLOGIA

Este é um estudo transversal retrospectivo, em que foram levantados no Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) os laudos dos exames histopatológicos e imuno-histoquímicos de PNH realizados no CPA-IAL, laboratório de referência macrorregional para diagnóstico de FA, recebidos no ano de 2017, de janeiro a dezembro, por meio do Programa de Vigilância de Epizootias, procedentes de vários estados. O estudo foi aprovado na comissão de ética em uso de animais do Instituto Adolfo Lutz (número 11/2016). Os exames histopatológico e imuno-histoquímico foram realizados de acordo com os procedimentos padrões descritos no Programa de Gestão da Qualidade Laboratorial do Núcleo de Anatomia Patológica, que envolvem processamento histológico de fragmentos de órgãos fixados em formalina, com obtenção de lâminas coradas em H&E. Considerou-se resultado “positivo”

na histopatologia fígados exibindo alterações clássicas de FA, ressaltando-se necrose/apoptose abundante zonal com presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, os quais são considerados sugestivos de FA na rotina diagnóstica. Para IHQ, apenas os fragmentos de fígado foram processados, com incubação com anticorpo anti-FA (policlonal, produzido pela virologia do IAL, camundongo) seguida por amplificação com micropolímeros conjugados com enzimas e revelação com substâncias cromógenas. Todos os casos foram avaliados sob microscopia óptica, por dois observadores, com descrição histopatológica e reação imuno-histoquímica classificada como positiva, negativa, insatisfatória ou inadequada, conforme detalhado na figura 1. Os dados foram compilados e tabelas e gráficos foram formulados em Excel (Microsoft, Califórnia, EUA). O índice de concordância (kappa) entre o exame histopatológico e imuno-histoquímico foi calculado com o programa Quick calcs® (Graphpad® softwares, Califórnia, EUA).

RESULTADOS

Foram recebidas amostras de 2.171 primatas não humanos no ano de 2017, provenientes dos Estados de São Paulo (n=1.997), Santa Catarina (n=47), Paraná (n=43), Rio Grande do Sul (n=42), Espírito Santo (n=24), Mato Grosso do Sul (n=8), Paraíba (n=6), Sergipe (n=4). Quanto aos gêneros, foram 935 (43,07%) amostras de *Callithrix*, 718 (33,07%) de *Alouatta*, 28 (1,29%) de *Callicebus*, 95 (4,38%) de *Sapajus* e 395 (18,19%) não identificados quanto ao gênero.

Destas, 1.980 (1.980/2.171 ou 91,20%) amostras apresentaram-se satisfatórias para análise histopatológica e IHQ, 132 (132/2.171 ou 6,00%) marcadamente autolisadas e 59 (59/2.171 ou 2,80%) inadequadas, devido a não representação do fígado. 580 (580/1.980 ou 29,29%) e 46 (46/132 ou 34,85%) amostras foram positivas dentre as satisfatórias e as autolisadas, respectivamente (tabela 1).

Figura 1. Quadro representativo das categorias diagnósticas de imuno-histoquímica de Febre Amarela.

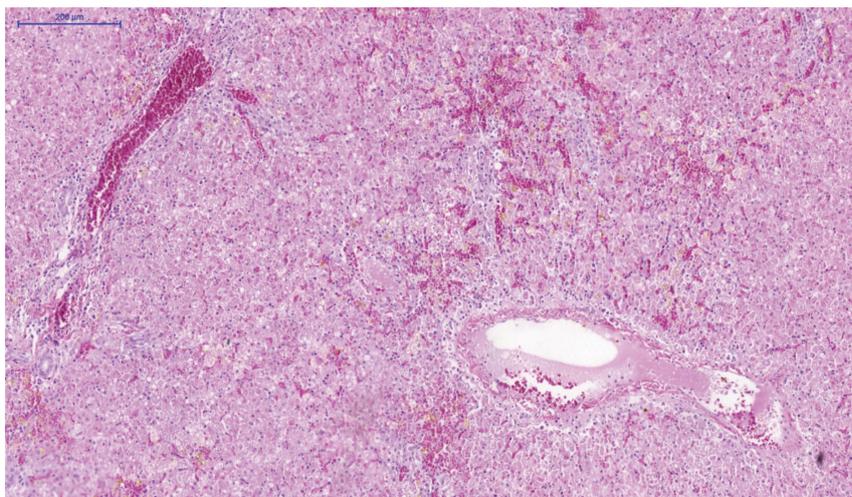
| Categoria diagnóstica | Aspecto microscópico | Significado |
|------------------------------|--|---|
| Positivo | Precipitação de cromógeno acastanhado ou avermelhado intracitoplasmático em hepatócitos. | Presença de antígeno viral de Febre Amarela em hepatócitos. |
| Negativo | Ausência de precipitação de cromógeno nos hepatócitos. | Antígeno viral de Febre Amarela não detectável em hepatócitos. |
| Insatisfatório | Ausência de precipitação de cromógeno com indistinção dos componentes celulares devido à autólise. | A autólise marcante não permite afirmar que a ausência de precipitação de cromógeno indique ausência de antígeno viral, podendo representar falso negativo. |
| Inadequado | Impossibilidade de realizar a imuno-histoquímica devido à ausência de fígado. | A ausência de fígado não permite inferir sobre presença ou ausência de antígeno viral. |

Tabela 1. Frequência da positividade para febre amarela na imuno-histoquímica de acordo com a satisfatoriedade da amostra. Instituto Adolfo Lutz, 2018

| | Positivos | % | Negativos | % | Inadequados ou insatisfatórios | % | Total |
|--------------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------------|-------------|--------------|
| Satisfatórios | 580 | 29,29 | 1400 | 70,71 | 0 | 0 | 1.980 |
| Autolisados | 46 | 34,85 | 0 | 0 | 86 | 65,15 | 132 |
| Não enviado fígado | 0 | 0 | 0 | 0 | 59 | 100 | 59 |
| Total | 626 | 28,83 | 1.400 | 64,49 | 145 | 6,68 | 2.171 |

Histologicamente, 577 (577/580 ou 99,48%) dos casos positivos, com análise satisfatória, apresentaram achados morfológicos clássicos compatíveis com FA, que incluíram esteatose macro e/ou microgoticular em intensidades variáveis, necrose/apoptose zonal, predominantemente médio-zonal, a maciça, com presença de corpúsculos hipereosinofílicos arredondados (corpúsculos de Councilman-Rocha Lima) e discreto infiltrado inflamatório (figura 2). Os três casos histologicamente distintos e positivos na IHQ, apesar de não exibirem os achados morfológicos típicos, apresentaram corpúsculos apoptóticos (2/3) e hepatite necrotizante discreta (1/3). Treze casos satisfatórios (13/1400 ou 0,93%) apresentaram quadro morfológico hepático suspeito para FA, mas foram negativos para FA na IHQ.

A análise histopatológica foi insatisfatória nos casos marcadamente autolisados,

**Figura 2.** *Alouatta* spp, fotomicrografia de fígado, coloração em H&E. Achados histológicos compatíveis com FA, em que há necrose/apoptose maciça de hepatócitos. Instituto Adolfo Lutz, 2018

entretanto, ocasionalmente observou-se nos casos positivos a presença de estruturas hipereosinofílicas compatíveis com corpúsculos de Councilman-Rocha.

A IHQ para FA foi apenas realizada no fígado, onde há a maior concentração de antígenos virais, portanto, os casos em que fragmentos de fígado não foram encaminhados para análise foram considerados inadequados para a técnica. Os casos positivos apresentaram quantidade moderada a abundante de antígeno viral, com imunorreatividade intensa, principalmente nas células mais preservadas localizadas ao redor do espaço porta (figura 3). Nos casos autolisados, a intensidade da imunomarcagem foi mais fraca e, por vezes, focal; entretanto, mesmo nestas condições, permitiu o diagnóstico IHQ de FA. Nenhum caso positivo, o qual estivesse satisfatório para a análise, exibiu ausência de alterações histopatológicas, evidenciando excelente correlação entre histopatologia e IHQ. A concordância entre a histopatologia e a IHQ foi muito boa (99,19% de concordância), com kappa = 0,98.

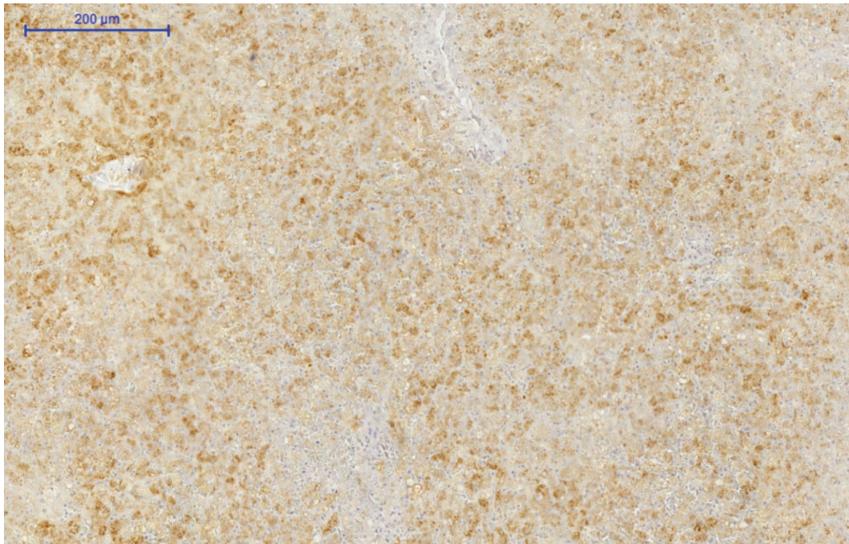


Figura 3. *Alouatta* spp, fotomicrografia de fígado, imuno-histoquímica com anticorpo anti-febre amarela (policlonal, *in house*), contra-coloração com hematoxilina. Deposição de cromógeno acastanhado em citoplasma de hepatócitos em moderada quantidade, indicando a positividade

DISCUSSÃO

Este estudo apresentou a casuística de epizootias de PNH recebidos e avaliados morfológicamente e por IHQ no CPA-IAL. A histopatologia é uma ferramenta importante para o diagnóstico de FA, uma vez que a doença exibe padrão morfológico típico de lesão hepática, com morte celular hepatocitária zonal intensa, predominantemente mediozonal, esteatose macro e microgoticular, escassez de infiltrado inflamatório e presença de corpúsculos arredondados hipereosinofílicos, denominados corpúsculos de Councilman-Rocha Lima.^{11,12} Vieira et al¹¹ observaram em 10 casos de FA em humanos, morte celular hepatocitária com presença de corpúsculos hipereosinofílicos em todos os casos. Quaresma et al.¹² também descreveram presença dos corpúsculos em 100% de amostras avaliadas de 53 pacientes humanos com FA. Em PNH, foi observada presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima em 74,5% dos casos de *Alouatta* spp. positivos para FA.¹³ No presente estudo, 99,48% dos casos positivos para FA, adequados para análise histopatológica, apresentaram achados compatíveis com a doença, com

presença de morte celular zonal abundante. Dois casos adicionais, apesar de não exibirem padrão típico nas secções avaliadas de fígado, apresentaram corpúsculos hipereosinofílicos em discreta quantidade, totalizando 99,83% de casos com presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima.

A IHQ mostrou-se uma ferramenta importante para confirmação do diagnóstico morfológico de FA, visto que outras enfermidades infecciosas podem também apresentar hepatite necrotizante, como toxoplasmose,¹⁴ além de corpúsculos hipereosinofílicos, os quais podem ser observados nas hepatites dos calitriquídeos e outras enfermidades hepáticas.^{11,15} No presente estudo, 13 casos exibiram alterações morfológicas suspeitas para FA na histopatologia, mas foram descartados pelo exame IHQ, evidenciando a necessidade da detecção viral para conclusão diagnóstica dos suspeitos.

A presença do antígeno viral é detectada no fígado, com frequência baixa descrita também no rim e coração de humanos.¹⁶ Deste modo,

no CPA-IAL, o fígado é órgão obrigatório para o diagnóstico da enfermidade, justificando o resultado inadequado em casos em que o órgão não foi submetido. Futuramente, o grupo pretende avaliar sistematicamente a imunomarcagem em outros tecidos nos casos de primatas não-humanos, apesar de não ter observado, até o momento, de modo empírico, marcação consistente e frequente em qualquer outro órgão. Apesar disto, a avaliação histopatológica de outros tecidos auxilia o patologista na conclusão diagnóstica do caso, principalmente no estabelecimento de diferenças e diagnóstico de outras enfermidades, as quais também podem ser zoonóticas.

Outro fator limitante para o diagnóstico de FA é a autólise da amostra, por fixação tardia do material ou inadequada, como por congelamento. A autólise avançada torna insatisfatória a avaliação histopatológica e prejudica a análise IHQ, entretanto, 34,85% dos casos autolisados exibiram positividade consistente, mostrando que a técnica é válida mesmo nestas situações, conforme já relatado anteriormente.^{17,18}

A histopatologia pode ser empregada como uma ferramenta importante para triagem dos casos de PNH, realizando-se IHQ apenas das amostras com alterações microscópicas hepáticas suspeitas, especialmente presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, visto que todos os casos positivos para FA apresentaram algum grau de alteração histopatológica e observou-se uma concordância muito boa entre os métodos. Esta proposta refere-se apenas à avaliação dos blocos parafinados, mantendo-se, em paralelo, sempre que possível, a detecção do vírus por meio do RT-qPCR, conforme

preconizado pelo programa de vigilância de epizootias.⁷ O patologista, ao realizar a análise microscópica, deve ser criterioso e selecionar não apenas os casos clássicos, mas também aqueles que exibam presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima em algum grau. Este cuidado deve ser redobrado nos períodos interepidêmicos, pois o observador pode ser tendencioso ao resultado “não suspeito”, principalmente naqueles casos com achados mais discretos. Os tecidos que apresentarem autólise avançada na histologia devem ser avaliados em sua totalidade pela IHQ, devido à presença de antígeno viral detectável pelo método em circunstâncias que impossibilitaram uma classificação morfológica adequada pela coloração de H&E. O exame IHQ é mais oneroso, com execução mais complexa e longa. Restringi-lo apenas aos casos suspeitos, duvidosos ou insatisfatórios na histologia reduziria o tempo de liberação dos casos negativos e os custos com os exames de epizootias de PNH. É importante evidenciar que, para uma análise adequada e triagem dos casos por histopatologia, é fundamental um profissional capacitado e especializado para tal finalidade, no caso, um médico veterinário patologista. Ambos os exames, histopatologia e IHQ, exigem fixação na formalina e conservação e transporte a temperatura ambiente, o que torna o encaminhamento mais simples. Localidades distantes do laboratório de referência, inclusive de outros estados, podem enviar as amostras sem risco de prejuízo de análise, uma vez que a fixação no momento da colheita tenha sido feita da forma correta.

Ressalta-se que, idealmente, a vigilância de epizootias deve ser realizada por meio

de métodos adicionais à avaliação do bloco parafinado, como a técnica de RT-qPCR a partir do material fresco congelado, e que a proposta da histopatologia como triagem não se aplica aos exames moleculares, visto que eles não foram abordados nesta análise. A técnica de RT-qPCR é um método sensível e específico, que pode apontar casos adicionais de FA não detectados por outros métodos diagnósticos, incluindo histopatológico e imuno-histoquímico, especialmente em fases virêmicas ainda sem manifestação da doença.¹⁹ O isolamento viral, apesar de menos empregado em larga escala na rotina diagnóstica, permite estudos experimentais complementares e aplicação de técnicas de sequenciamento, as quais podem revelar informações importantes sobre a dispersão do vírus e auxiliar na compreensão dos surtos de FA.²⁰ Uma vigilância acurada de epizootias necessita de visão multidisciplinar, com emprego de diferentes técnicas e complementada pela avaliação de vetores e de casos humanos.

Como limitação deste estudo, não foi realizada a avaliação comparativa entre os diferentes gêneros de primatas quanto aos achados histológicos, entretanto este tópico merece investigações futuras, as quais serão conduzidas pelo grupo.

CONCLUSÃO

Os exames histopatológico e IHQ, em conjunto, são métodos importantes para diagnóstico de FA para o programa de Vigilância de Epizootias, com preservação das amostras em uma solução de fácil acesso, a formalina 10%, com manutenção e transporte à temperatura ambiente. Houve concordância muito boa entre a histopatologia e a IHQ, indicando que a histopatologia pode ser utilizada como método de triagem para a realização da IHQ em epizootias, permitindo um uso racional e criterioso dos recursos nos laboratórios de referência de patologia do Sistema Único de Saúde. Ressalta-se também a importância do médico veterinário patologista no laboratório de Saúde Pública, especialmente na vigilância de epizootias.

Agradecimentos

Aos profissionais do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz e do Núcleo de Gerenciamento de Amostras Biológicas envolvidos na recepção e processamento das amostras de primatas não humanos; aos profissionais das vigilâncias epidemiológicas estaduais e municipais pela colheita, encaminhamento e registro das amostras; ao Centro de Virologia do IAL que produziu e, gentilmente, forneceu o anti-corpo anti-FA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization [internet]. Updates on yellow fever vaccination recommendations for international travelers related to the current situation in Brazil. c2018. [acesso em 19 jan 2018]. Disponível em: <http://who.int/ith/updates/20180116/en/>
2. Secretaria de Estado da Saúde (SP), Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Profº Alexandre Vranjac”, Divisão de Zoonoses, Central CIEVS-SP, Núcleo de Informação em Vigilância Epidemiológica. Situação Epidemiológica da Febre Amarela

- no Estado de São Paulo, Monitoramento (sazonalidade) 2017. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2017; 14(166):17-20.
3. Vasconcelos PFDC. Yellow fever. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 36(2):275-93.
 4. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2014;5(3):55-64.
 5. Soper FL. Jungle Yellow Fever. A New Epidemiological Entity in South America. Rev. hig. saude publica. 1936; 10(4).
 6. Almeida MAB, Cardoso JDC, dos Santos E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJ 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 negl. trop. dis. 2014; 8(3):e2741.
 7. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. 2.ed. Brasília (DF); 2017.
 8. Reis NR, Peracchi AL. Primatas brasileiros. Technical Books Ed.; 2008.
 9. Grizzle WE, Fredenburgh JL e Myers RB. Fixation of tissues. Theory and practice of histological techniques. 2008; 6:53-74.
 10. Rhodes A. Fixation of tissues. Theory and Practice of Histological Techniques. 2012; 7:69-93.
 11. Vieira WT, Gayotto LC, Lima CP, Brito T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. Histopathology. 1983;7(2):195-208.
 12. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. Virology. 2006; 345(1):22-30.
 13. Leal SG, Romano APM, Monteiro RV, Melo CBD, Vasconcelos PFDC, Castro MBD. Frequency of histopathological changes in Howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2016; 49(1):29-33.
 14. Epiphanyo S, Guimarães MABV, Fedullo DL, Correa SH, Catão-Dias JL. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. J. zoo wildl. med. 2000; 31(2):231-5.
 15. Ramsay EC, Montali RJ, Worley M, Stephensen CB, Holmes KV. Callitrichid hepatitis: epizootiology of a fatal hepatitis in zoo tamarins and marmosets. J. zoo wildl. med. 1989;178-83.
 16. Brito T, Siqueira SAC, Santos RTM, Nassar ES, Coimbra TLM, Alves VAF. Human fatal yellow fever: immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. Pathology-Research and Practice. 1992; 188(1-2):177-81.
 17. Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. Am. j. trop. med. hyg. 1991; 45(4):408-17.
 18. Fernandes N, Cunha M, Guerra J, Ressio RA, Cirqueira CS, Iglezias SD et al. Outbreak of Yellow Fever among Nonhuman Primates, Espírito Santo, Brazil, 2017. Emerg. infect. dis. 2017; 23(12):2038-2041. doi:10.3201/eid2312.170685.

19. Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J. clin. microbiol.* 2012; JCM-01799.
20. Faria NR, Kraemer MU, Hill S, de Jesus JG, de Aguiar RS, Iani FC et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science.* 2018; 361(6405):894-899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>
-
-