

O papel do diagnóstico laboratorial da influenza

The role of laboratory diagnosis of influenza

La función del diagnóstico de laboratorio para la influenza

Wyller Alencar de Mello

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brazil

The World Health Organization National Influenza Center

INTRODUÇÃO

Desde 1948 a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem organizado uma rede internacional de laboratórios destinada à vigilância dos vírus influenza. Atualmente a Rede Mundial de Vigilância da Influenza (*Global Influenza Surveillance Network - GISN*) abrange 128 Centros de Referência para a Influenza (*National Influenza Centers - NICs*) distribuídos por 89 países. Dentre suas atribuições, os NICs são responsáveis por coletar e receber os espécimes e isolados de vírus originados de pacientes suspeitos de estarem infectados pelos vírus influenza, bem como por conduzir a análise laboratorial preliminar. Os isolados de vírus representativos são então selecionados e transportados para um dos quatro Centros Colaboradores da OMS (*WHO Collaborating Centers - WHOCCs*) para referência e análises antigênica e genética avançadas. Com base nos resultados coletados, a OMS produz recomendações anuais para a composição da vacina contra a influenza. Os NICs também alertam a OMS sobre surtos incomuns de influenza ou doenças assemelhadas à influenza e detectam isolados de vírus não subtipáveis e de baixa reatividade face ao uso de reagentes diagnósticos da OMS, adquiridos por meio da GISN. De acordo com os termos de referência acordados (www.who.int/csr/disease/influenza/TORNICs.pdf), os NICs devem disseminar as informações geradas na rede FluNet (www.who.int/flu-net), uma ferramenta baseada na Internet destinada ao apoio e coordenação da vigilância e registro da influenza em escalas nacional e internacional.

O diagnóstico laboratorial da influenza é uma importante ferramenta para a saúde pública e se tornou o fator fundamental para a prevenção, contenção, vigilância e manejo terapêutico de pacientes. Neste contexto, há muitos métodos laboratoriais que permitem a identificação dos vírus influenza circulando nas comunidades.

As abordagens diagnósticas utilizadas para a identificação do vírus incluem a cultura de vírus, a detecção de antígenos virais, como os testes de

imunofluorescência e os métodos de teste de ácido nucleico. Um diagnóstico presuntivo pode ser feito por um teste rápido válido para determinação do antígeno. A detecção de anticorpos é normalmente realizada por testes de neutralização do vírus (NT) e de inibição da hemaglutinação (IH), que são conduzidos para monitorar a soroconversão em uma cepa viral específica ou para determinar o status imunológico (após a vacinação, por exemplo).

A sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico para influenza pode variar de acordo com o laboratório que aplica determinada técnica, com o tipo de teste utilizado e/ou o tipo de espécime analisado.

Como os testes laboratoriais para o diagnóstico de influenza apresentam limitações que podem levar a resultados equivocados, os seus achados devem ser interpretados em conjunto com o histórico clínico do paciente. Resultados falsos negativos podem ocorrer devido à baixa quantidade de analito viral; à existência de espécimes coletadas manuseadas e/ou transportadas de forma inadequada; à presença de inibidores virais; e à emergência de novos subtipos para os quais os testes não apresentam sensibilidade ou especificidade. Os achados laboratoriais falsos positivos podem resultar de erros laboratoriais, tanto de ordem administrativa como operacional, bem como da especificidade subótima do teste em questão.

ESPÉCIMES RESPIRATÓRIOS CLÍNICOS

Os vírus da influenza humana replicam principalmente nas células do epitélio colunar do trato respiratório. A principal via de transmissão são as secreções respiratórias transportadas pelo ar. A coleta de amostras do trato respiratório para o diagnóstico clínico do vírus influenza deve procurar maximizar a colheita de células epiteliais infectadas pelo vírus. Aspirados nasofaríngeos (ANF) têm um maior teor celular e são superiores aos swabs nasofaríngeos (SNF) no que concerne ao isolamento do vírus influenza. Os swabs e as lavagens de garganta são de uso limitado no diagnóstico de influenza, uma vez que a maior parte das células capturadas por meio desta técnica é do epitélio escamoso. Os ANF, SNF e as lavagens são aceitos para a cultura, imunofluorescência, e detecção de antígeno viral.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Wyller Alencar de Mello

Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia

Rodovia BR 316, km 7, s/nº, Levilândia

CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil

E-mail: wyllermello@iec.pa.gov.br

Os SNF devem ter ponta de algodão, raiom ou dracon. Bastões de madeira devem ser evitados por causa do potencial de lixiviação dos conservantes utilizados na fabricação da madeira nos meios de transporte e inibição do transporte posterior para a cultura de células e detecção do ácido nucleico do vírus. Os swabs de alginato de cálcio também devem ser evitados, pois o alginato pode ter ação inibidora para algumas culturas de células.

As condições de transporte devem ser otimizadas para garantir uma máxima recuperação dos espécimes. Os espécimes devem ser transportados a uma temperatura de 4° C ou congelados a -70° C. O meio de transporte viral (MTV) utilizado pode ser determinante para a garantia de uma boa recuperação dos vírus. Sugere-se que o MTV inclua uma solução salina balanceada com pH neutro e estabilizadores de proteína, como a gelatina ou a albumina sérica bovina (ASB) e antibiótico para reduzir/inibir o crescimento de organismos comensais e bactérias. O uso de soro de soro fetal bovino em MTV para o transporte de espécimes deve ser evitado para que haja o isolamento do vírus influenza. Entre os meios apropriados, podem ser citados a Solução Salina Equilibrada de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*) e Meio Mínimo Essencial de Earle (*Earle's Minimal Essential Medium*) com ágar de infusão de vitela, gelatina ou ASB.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

CULTURA VIRAL

O isolamento viral é uma técnica altamente sensível e muito útil para o diagnóstico de infecções virais, quando utilizado com espécimes clínicos de boa qualidade. O padrão ouro para a detecção laboratorial do vírus influenza continua sendo a cultura de isolamento. O vírus pode ser cultivado em cultura de células e em ovos embrionados.

Para um máximo isolamento em ovos, embriões com 10 a 11 dias de idade são simultaneamente administrados via inoculação intra-amniótica e intra-alantoidiana com um espécime clínico. Os ovos são incubados a 33-35° C, e as amostras dos fluidos amniótico e alantoide são testados para a verificação da presença do vírus. Apesar de a inoculação em ovos ser considerada muito trabalhosa, a sua utilização ainda é bastante recomendada, pois este permanece sendo o melhor método para a geração rápida de títulos muito elevados de vírus. Outro argumento a ser levado em consideração a favor da inoculação em ovos é o de que os vírus candidatos a vacina têm de ser isolados em ovos. A tendência de isolar o vírus influenza em culturas de células, ao invés de em ovos resultou na diminuição da disponibilidade de vírus vacinais apropriados. Por esta razão, os laboratórios que têm essa capacidade têm sido bastante estimulados a continuar realizando o isolamento viral em ovos.

A replicação do vírus influenza em cultura de células, feita geralmente com células do tipo MDCK, é detectada pela observação do efeito citopático (EC) e/ou da expressão da hemaglutinina viral (HA) na superfície das células infectadas. A cultura de células é um método muito

sensível, mas enquanto as expressões do EC ou da HA normalmente levam dois a três dias para se desenvolverem, ela pode durar até sete a dez dias.

É amplamente aceita a tese de que o isolamento de vírus em ovos embrionados/culturas de células com sua posterior identificação por técnicas imunológicas ou genéticas ou por microscopia eletrônica é o método padrão para o diagnóstico viral.

De um modo geral, a maior vantagem apresentada pelo método de isolamento do vírus é o fato de ele amplificar o vírus do espécime original e torná-lo disponível para uma posterior caracterização antigênica e genética, bem como para o teste de suscetibilidade a drogas, caso seja necessário.

TESTES DE IMUNOFLORESCÊNCIA

Os testes de imunofluorescência (IF) têm sido utilizados para a identificação direta do vírus influenza em espécimes respiratórios que contenham células esfoliadas. As células em ANF ou em swab nasal são lavadas em solução tampão gelada, ressuspensas e colocadas em lâminas microscópicas. Após a fixação em acetona, o preparo das células reage com anticorpos específicos disponíveis comercialmente. Estes anticorpos são diretamente conjugados ao fluorocromo (IF direta) ou reagem com um segundo anticorpo espécie-específico e conjugado a um fluorocromo (IF indireta). As amostras de soro policlonal utilizadas como anticorpos para detecção apresentam níveis demasiadamente altos de corante para os restos celulares e bactérias, e normalmente anticorpos monoclonais são utilizados para fornecer a sensibilidade e especificidade requeridas para este teste. A IF indireta é geralmente mais sensível que a IF direta, porém esta última é mais popular por causa do menor tempo de realização. Quando comparados à cultura de vírus influenza, ambos os métodos são considerados menos sensíveis atualmente. Espécimes coletados ou transportados inadequadamente (com ausência de material celular ou não colocados em meios de transporte, ou refrigerados durante o transporte, por exemplo) também contribuem para a redução da sensibilidade.

TESTES RÁPIDOS PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS

Há testes rápidos comerciais que podem detectar os vírus influenza em até 15 minutos. Alguns testes já estão aprovados para a utilização em ambiente ambulatorial, enquanto outros devem ser usados em laboratórios clínicos com grau moderado de complexidade. Estes testes rápidos diferem de acordo com o tipo de vírus influenza que podem detectar e se podem ou não fazer a distinção entre tipos de influenza. Os diferentes testes podem detectar: 1) apenas os vírus da influenza A; 2) tanto os vírus da influenza A como da influenza B, mas não entre um e outro; 3) tanto os vírus da influenza A e da influenza B e podem distinguir um do outro.

Nenhum dos testes fornece qualquer informação acerca dos subtipos de influenza A. Os tipos de espécimes aceitáveis para uso (i.e., ANF, SNF e lavagens) também variam de acordo com o teste. A especificidade e, em

particular, a sensibilidade dos testes rápidos são menores que as de cultura viral e variam de acordo com o teste. Devido à sensibilidade mais baixa dos testes rápidos, os médicos devem considerar a hipótese de confirmar os testes negativos por cultura viral ou outros métodos, pois há possibilidade de ocorrerem falsos negativos nos testes rápidos, especialmente durante períodos de pico da atividade do vírus influenza nas comunidades. Em contraste, resultados falsos negativos de testes rápidos são menos frequentes, mas podem ocorrer em períodos de baixa atividade do vírus influenza. Portanto, ao interpretar os resultados de um teste rápido para o vírus influenza, os médicos devem levar em consideração os valores preditivos positivos e negativos do teste no contexto do nível de atividade do influenza na comunidade. Folhetos explicativos e o laboratório responsável pela execução do teste devem ser consultados para a obtenção de maiores detalhes acerca do uso de testes rápidos de diagnóstico.

Os testes rápidos de diagnóstico são mais utilizados em hospitais e instituições. Nestes lugares, eles podem facilitar o reconhecimento precoce da influenza pela sua diferenciação de outras causas de febre em pacientes com histórico clínico complexo (pacientes com imunidade comprometida, por exemplo). Este procedimento faz com que se evite o uso inadequado de drogas antibacterianas, gera discussões informadas acerca do isolamento de pacientes e permite a sua alta em menor tempo. Além disso, os testes rápidos poderiam levar a um reconhecimento precoce de surtos em instituições e a um uso mais eficaz de estratégias de prevenção.

TESTES DE ÁCIDO NUCLEICO

O teste de ácido nucleico mais comum para o diagnóstico da influenza é a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), porém a amplificação baseada na transcrição da sequência de ácidos nucleicos também tem sido aplicado de forma eficaz. Estes testes são considerados sensíveis, específicos e versáteis para o diagnóstico da influenza. Uma vez extraído do espécime, o RNA viral pode ser utilizado no teste de RT-PCR não apenas para identificar o vírus como sendo o influenza, mas também para determinar seu subtipo e cepa por meio da análise sequencial. Os genótipos virais podem ser rapidamente determinados por meio do sequenciamento de alguns ou todos os genes virais, embora a genotipagem dos vírus diretamente dos espécimes dos pacientes geralmente requiera algum nível de amplificação na cultura celular.

A principal vantagem destes testes moleculares é a possibilidade de apresentarem resultados no mesmo dia, sem qualquer comprometimento de sua sensibilidade. No entanto, a coleta de espécimes clínicos para a cultura viral é essencial, pois apenas isolados de cultura podem ser utilizados para a produção de vacinas.

Recebido em / Received / Recibido en: 23/7/2009
Aceito em / Accepted / Aceito en: 1/10/2009