

**BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia**  
**Prof. Armando Ventura**

**Apostila de Virologia**

**Diagnóstico laboratorial dos vírus.**

Os exames para diagnóstico viral estão em constante evolução, acompanhando as últimas novidades metodológicas. A nossa proposta aqui não é de discutir em detalhe o que está sendo feito atualmente na rotina laboratorial, mas apenas alguns métodos e princípios amplamente aplicados. Podemos classificar os métodos para diagnóstico viral, de forma genérica, em: exames diretos, onde procura-se detectar na amostra clínica a presença dos vírus; ou exames indiretos, onde buscamos evidências de uma infecção viral passada pela presença de anticorpos contra esse vírus no soro do paciente (sorologia).

**Exames diretos**

Dispomos de um conjunto grande de técnicas para detecção da presença de um vírus:

1. Microscopia óptica: morfologia das células (efeito citopático) e corpos de inclusão.
2. Microscopia eletrônica: morfologia das partículas virais.
3. Detecção do antígeno: imunofluorescência direta, hemaglutinação, aglutinação passiva, ELISA direto (comentado adiante em sorologia).
4. Detecção do genoma viral: técnicas de hibridização, PCR.

A visualização de efeito citopático através da microscopia óptica foi discutida e exemplificada na aula 1. A microscopia eletrônica, por não ser uma técnica aplicável em rotina de laboratórios clínicos devido ao custo e complexidade, não será comentada. Quanto à detecção dos genomas virais, assumimos que a base teórica e prática que lhes foi dada nas disciplinas de Bioquímica e Biologia Molecular, os torna aptos a compreender as muitas estratégias disponíveis para diagnóstico, envolvendo hibridização de ácidos nucleicos com sondas marcadas e detecção por um trecho específico de genomas virais por amplificação com a PCR.

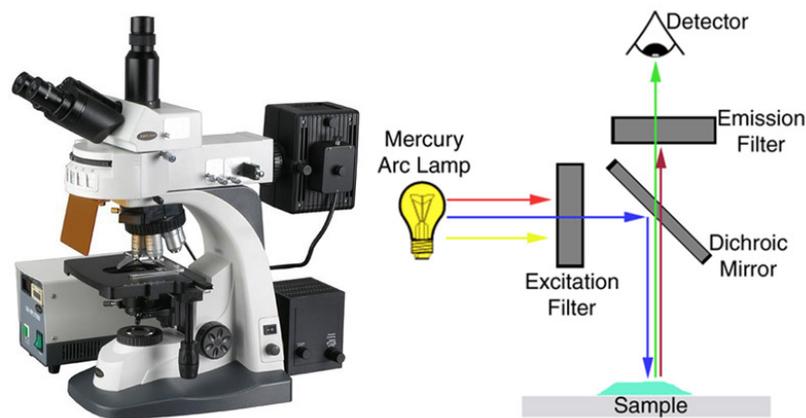
A seguir, comentaremos algumas das técnicas para detecção de antígenos. A vantagem dos métodos de detecção direta de antígenos é ter o resultado disponível rapidamente, minutos ou poucas horas. As desvantagens são: a sensibilidade é mais baixa (quando comparados à cultura celular chega a ser cinco vezes menor); a especificidade também é usualmente reduzida; há necessidade de bons espécimes.

**Imunofluorescência direta**

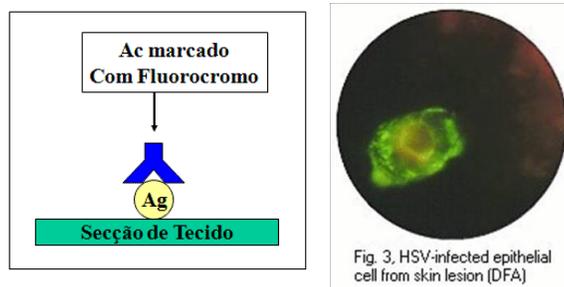
A imunofluorescência é baseada na utilização do microscópio de fluorescência (Fig 1) que é equipado com uma fonte de luz de alta energia, que pode ser selecionada por filtros em comprimentos de onda adequados para excitar fluoróforos. Na imunofluorescência direta anticorpos específicos contra antígenos de um determinado vírus podem ser conjugados a fluoróforos como o isotiocianato de fluorceína, que fluoresce em verde ao ser exposto à luz com um comprimento de onda dentro do espectro do ultra-violeta. Às Figs 2 e 3, as amostras de células foram fixadas a lâminas e incubadas com os anticorpos conjugados, antes da análise.

Amostras utilizadas em imunofluorescência direta para vírus frequentemente detectados:

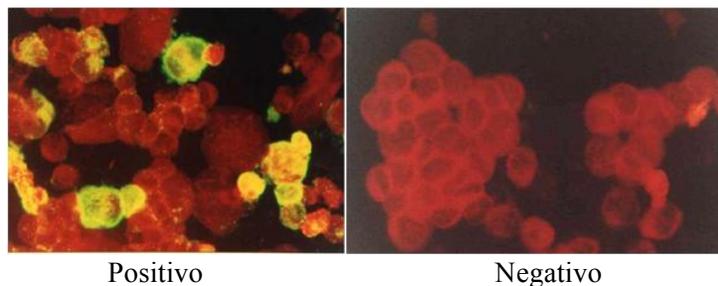
- Aspirado naso-faríngeo (vírus sincicial respiratório, Influenza A e B, Parainfluenza, Adenovirus)
- Fezes (Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus).
- Pele (Herpes Simplex, Varicela Zóster)
- Sangue (Citomegalovírus)



**Fig 1. Microscópio de Fluorescência**



**Fig 2. Esquema da imunofluorescência direta e Herpes Simplex (Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)**

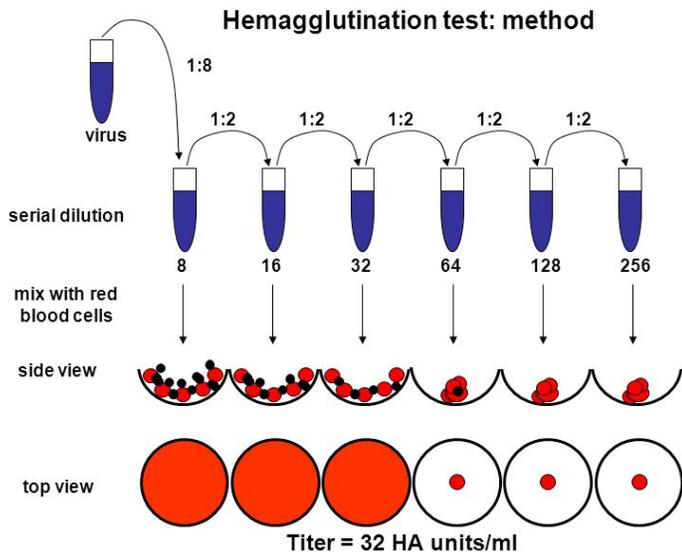


**Fig 3. Vírus respiratório sincicial humano. Células de aspirado naso-faríngeo. (Laboratório de Virologia Molecular, ICB-USP)**

### Hemaglutinação

Alguns vírus ligam a hemácias através de receptores existentes na superfície destas. Como resultado as hemácias aglutinam, sendo este fenômeno chamado de hemaglutinação. Hemácias em suspensão são colocadas em contato com diluições crescentes do vírus. Por ação da gravidade, as hemácias aglutinadas sedimentam de forma difusa. Quando não há vírus suficientes para fazer pontes entre as hemácias, estas sedimentam na forma de um botão concentrado no fundo arredondado dos pocinhos. No esquema à Fig 4 o título do estoque viral é de 32 unidades hemaglutinantes por ml. Uma unidade hemaglutinante é a quantidade mínima de vírus capaz de aglutinar as hemácias. O vírus da influenza, por exemplo, aglutina hemácias de galinha, cobaio,

carneiro e humanas do grupo O. O padrão é utilizar suspensões de hemácias a 1% em soro fisiológico.

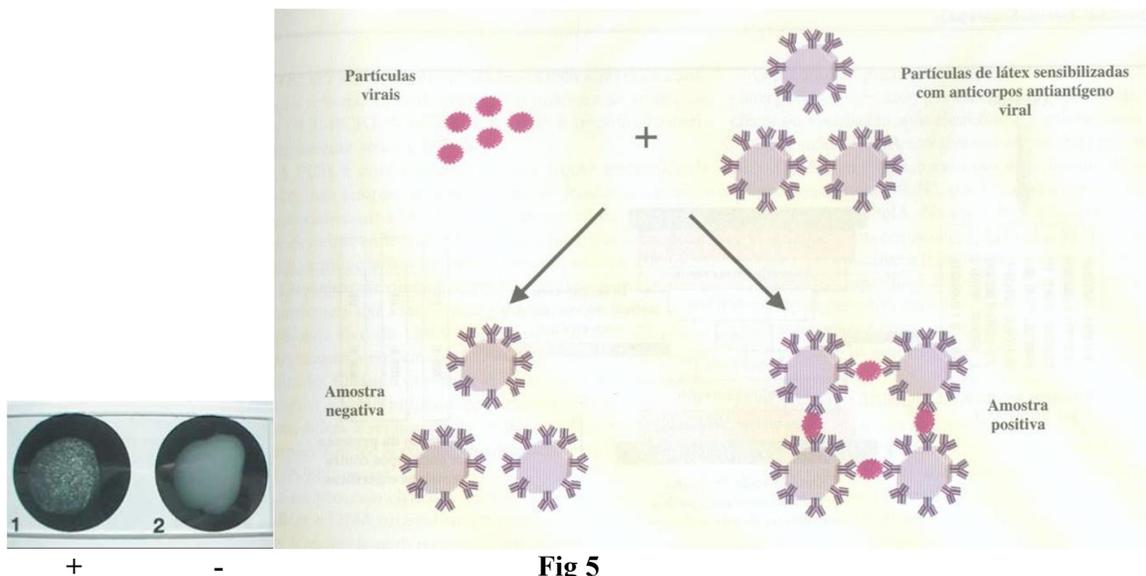


One HA unit :minimum amount of virus that causes complete agglutination of RBCs

**Fig 4**

### **Aglutinação passiva**

No teste de aglutinação passiva (Fig 5) suportes sólidos, como partículas de látex, são recobertas (sensibilizadas) com anticorpos específicos contra antígenos virais. Observa-se floculação da suspensão de partículas (antes leitosa) na presença do vírus. Exemplos de espécime são aspirados nasofaríngeos para verificar se há presença de vírus respiratórios, fezes para rotavírus, soro para Hepatite B e HIV, que podem ser coletados e testados no consultório médico.



**Fig 5**

Introdução à Virologia, Santos, Romanos, Wigg, Guanabara Koogan, 2002.

## Imunocromatografia

A imunocromatografia é baseada na reação com dois anticorpos específicos para o vírus, um conjugado a uma partícula visível (como *beads* de látex) que é misturado à amostra. Essa mistura é aplicada a uma extremidade e difunde numa membrana onde está fixado outro anticorpo específico contra o vírus que irá capturar o imunocomplexo mostrando um sinal de positividade (Figura 6). Exemplos de espécime para imunocromatografia são os mesmos da aglutinação passiva.

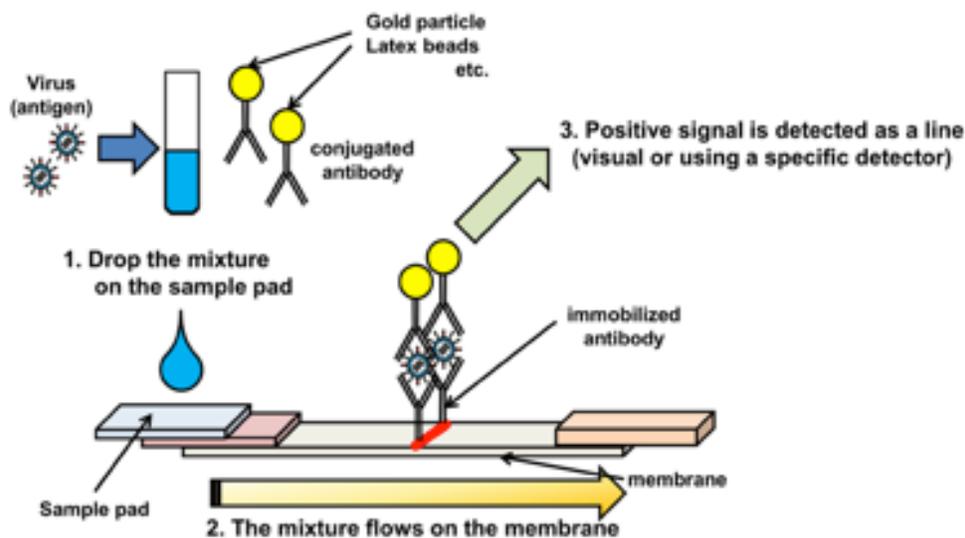


Fig 6

*Viruses* 2012, 4, 1235-1257

## Sorologia

As técnicas sorológicas são amplamente utilizadas, e visam detectar anticorpos específicos contra um dado vírus, no soro obtido a partir de sangue coletado dos pacientes. Uma característica importante dessas metodologias é a medição de reatividade frente a diferentes diluições do soro permitindo a obtenção de um título (maior diluição aonde ainda é observada reatividade). A detecção de um aumento nos títulos de anticorpos específicos entre as fases aguda e convalescente da infecção, ou a detecção de IgM na infecção primária, para um determinado vírus, confirmam esse agente como causador da patologia.

Crítérios para diagnosticar infecção primária:

- Aumento de 4 vezes ou mais no título de IgG ou anticorpos totais, dosados no soro obtido na fase aguda para a convalescente da doença (soro conversão).
- Presença de IgM.
- Um título alto de IgG ou anticorpos totais (pouco confiável).

Crítérios para diagnosticar reinfecção:

- Aumento de 4 vezes ou mais no título de IgG ou anticorpos totais, dosados no soro obtido na fase aguda comparado à convalescente.
- Ausência ou pequeno aumento de IgM.

O perfil sorológico típico após infecção aguda está apresentado à Fig 7. Após a reinfecção, IgM pode estar ausente ou presente em baixos níveis de forma transiente.

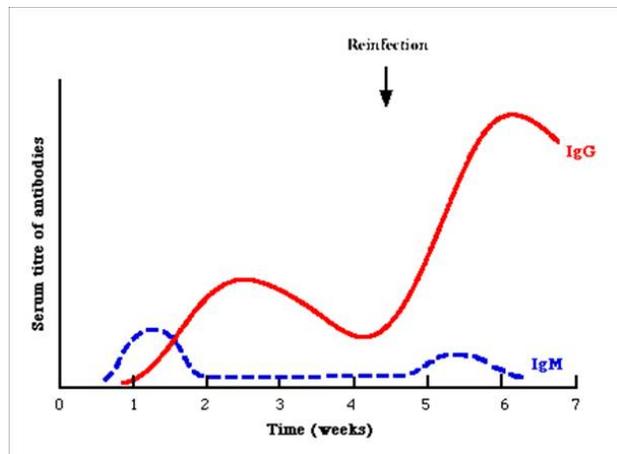


Fig 7

Comentaremos as seguintes técnicas sorológicas: Imunofluorescência indireta, Inibição da Hemaglutinação, ELISA e Western Blot.

### Imunofluorescência indireta.

O princípio da imunofluorescência indireta, para detecção de anticorpos específicos está esquematizado à Fig 8. A imunofluorescência indireta é feita reagindo os anticorpos do paciente com uma amostra de vírus conhecida (ex: numa cultura celular infectada fixada em lâminas). Se houverem anticorpos específicos para antígenos desse vírus, estes ficarão ligados à amostra.

Revela-se a presença desses anticorpos, pela adição de anticorpos específicos contra imunoglobulina humana (**anticorpos secundários**), obtidos imunizando-se animais de experimentação (camundongos, ratos, coelhos, cabras) com imunoglobulina humana purificada (ex: anti IgG). Esses anticorpos anti-Ig humana são **conjugados** quimicamente a fluoróforos (ex: isotiocianato de fluorocéina que emite fluorescência verde), que ao serem expostos à luz ultra-violeta no microscópio de fluorescência, emitem fluorescência típica. À Fig 9 temos a detecção do vírus sincicial respiratório humano infectando células Hep2 por anticorpos de um paciente com infecção respiratória (laboratório de RNA vírus, ICB-USP). Nessa mesma figura, temos um soro controle negativo para mostrar que o anticorpo secundário conjugado não está reconhecendo as células de forma inespecífica.

É possível titular o nível de anticorpos fazendo diluições seriadas do soro do paciente, e registrando a diluição máxima em que ainda é observada imunofluorescência. Os anticorpos secundários são reagentes muito versáteis, úteis para detectar anticorpos humanos contra diferentes antígenos em diferentes protocolos experimentais.

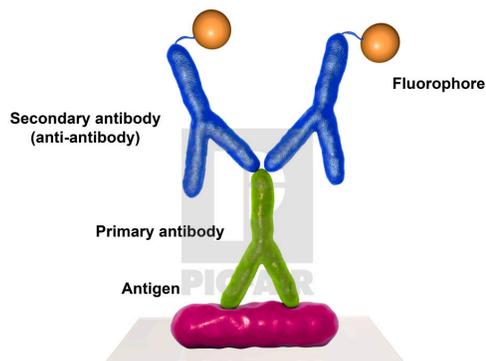
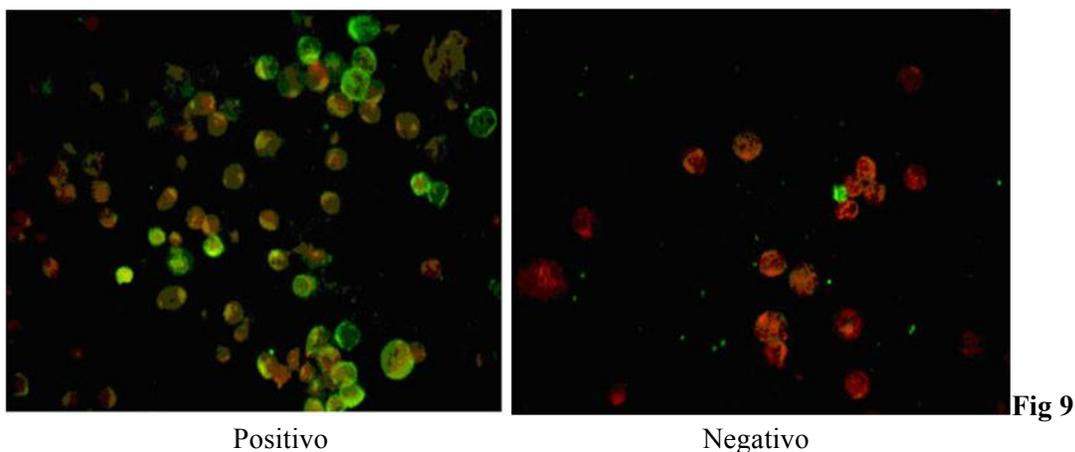


Fig 8



### Inibição da Hemaglutinação

As hemaglutininas virais são antigênicas e, quando um vírus hemaglutinante infecta o organismo humano ou animal, há a produção de anticorpos específicos contra as hemaglutininas virais. Esses anticorpos presentes no soro são capazes de se combinar com o vírus *in vitro*, inibindo a hemaglutinação (Fig 10). Este é o princípio da **reação de inibição da hemaglutinação**, que tem grande utilidade no diagnóstico das viroses. Esta reação pode ser usada para identificar vírus isolados de pacientes usando anticorpos padrão específicos, ou ainda para dosar anticorpos no soro de pacientes (titulação), usando vírus padrão mantidos no laboratório.

Para fazer o diagnóstico por titulação, deve-se colher duas amostras de soro do paciente: uma na fase aguda (logo que se manifesta a doença), outra na fase convalescente (quando cessam os sintomas, em torno de duas semanas depois). Os soros são diluídos (diluição seriada, ver Fig 4), e misturados a 4 unidades hemaglutinantes do vírus (duas diluições abaixo da que contém uma unidade hemaglutinante, ver Fig 4). Isso é feito para termos certeza de que não haverá falha na hemaglutinação. Em seguida são adicionadas as hemácias (suspensão 1%) e feita a incubação em pocinhos com fundo arredondado.

O título será dado pela maior diluição em que ainda ocorre inibição da hemaglutinação. Se houver um aumento do título de anticorpos inibidores da hemaglutinação de pelo menos 4 vezes para um determinado vírus pode-se fazer um diagnóstico seguro de que a infecção foi causada por esse vírus. Este aumento de título, de pelo menos 4 vezes é chamado de **soro conversão**, conforme comentado anteriormente. À Fig 11 temos representado esquematicamente um resultado de inibição da hemaglutinação, identificando o influenza responsável por uma epidemia. À Fig 12 está apresentada uma foto de placa com um resultado “real” de inibição de hemaglutinação, mostrando uma soro conversão.

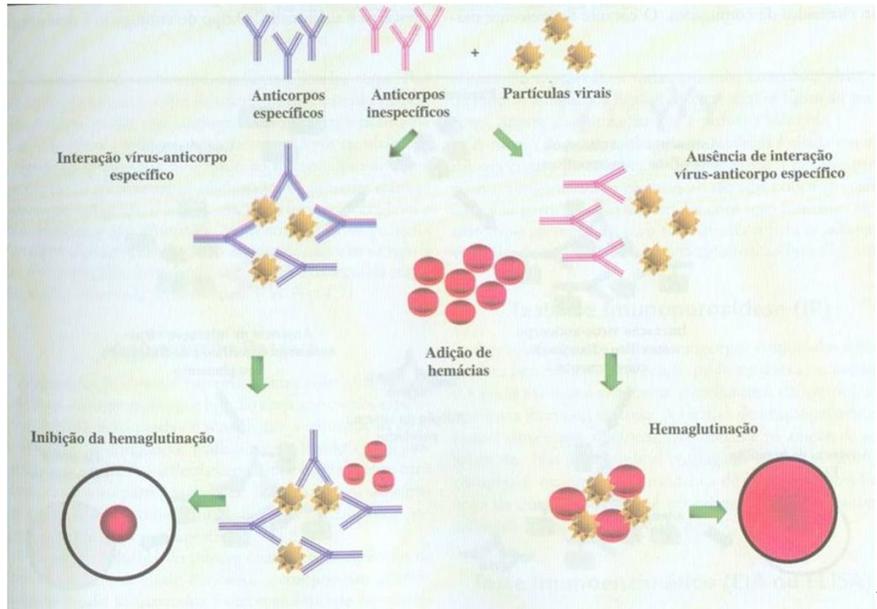


Fig 10

Introdução à Virologia, Santos, Romanos, Wigg, Guanabara Koogan, 2002.

Antigen	Serum of Patient 3	Serum Dilution									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256		
Influenza A / Taipei 98 (H <sub>2</sub> N <sub>1</sub> )	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Influenza A / Canton 00 (H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	C	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○
Influenza B / Osaka/99	A	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
	C	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○

Fig 11

Esquema de um resultado para inibição da hemaglutinação, identificando o influenza responsável pela epidemia.

Fase da doença	Diluição do soro	Diluição do soro			
		1/2	1/4	1/8	1/16 ....
Aguda	A	○	○	○	○
Convalescente	C	○	○	○	○

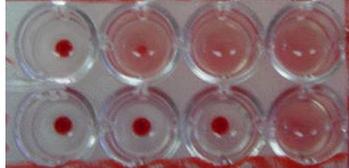


Fig 12

Foto de um resultado para inibição da hemaglutinação

## **ELISA e Western Blot (Diagnóstico de HIV)**

As duas últimas metodologias de sorologia que comentaremos são ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e Western Blot, que estão apresentadas como aplicação prática para o diagnóstico de HIV.

A seguir um breve comentário sobre a estrutura do HIV, visto em aula anterior. A partícula viral envelopada tem morfologia icosaédrica. O envoltório lipoprotéico apresenta duas proteínas glicosiladas, sendo a mais externa a gp120kDa, e a mais interna a gp41kDa. A matriz é formada pela proteína p17kDa. O capsídeo é formado pela proteína p24kDa e abriga o genoma viral. Ao genoma de RNA encontram-se associadas a transcriptase reversa (RT 66 kDa) e a integrase (IN – 32kDa). O genoma viral encontra-se recoberto pela nucleoproteína (p7kDa). O capsídeo abriga, ainda, a protease (p11kDa).

A antigenicidade dessas proteínas permite o diagnóstico da infecção baseado na procura dos anticorpos específicos contra o vírus, seja por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou pelo ensaio de Western-blot. A resposta imune varia de acordo com a carga viral ou a imunocompetência do hospedeiro. O diagnóstico da infecção por HIV é mais frequentemente realizado pelo ensaio de ELISA, utilizado para a triagem de rotina. No ELISA são detectados anticorpos contra uma mistura das proteínas virais, mas pode fornecer resultados falso-positivos. Todo resultado positivo pelo ELISA precisa ser confirmado por um ensaio mais específico, a reação de Western-blot, que determina os anticorpos específicos contra cada uma das proteínas virais.

Esses ensaios estão descritos a seguir na forma de “exercícios práticos”.

### **Determinação de anticorpos anti-HIV através do ensaio imunoenzimático ELISA.**

1. Uma microplaca (Fig 14) foi sensibilizada com uma mistura de antígenos de HIV: proteínas p24 e gp160 (precursora da gp120 e da gp41) obtidas a partir de vírus cultivados em células H9 e purificadas. Esta mistura de antígenos foi distribuída nas fileiras A, C, E e G da placa (ver esquema dos resultados adiante).
2. Como controle de especificidade foi feita sensibilização com antígenos celulares, obtidos de células H9 não infectadas, nas fileiras B, D, F e H (ver esquema dos resultados adiante).
3. As amostras de soro dos pacientes, bem como amostras de soro controle positivo e negativo foram adicionadas, em duplicata, às cavidades contendo antígenos virais e celulares (100 µl por cavidade).
4. A microplaca foi incubada por 90 min. a 37°C.
5. A seguir, a placa foi lavada, por 3 vezes, com tampão fosfato (PBS-Tween).
6. Para detectar a presença dos anticorpos, foram adicionados a cada cavidade 100 µl de soro de cabra anti IgG humana, conjugado à peroxidase.
7. A microplaca foi incubada por 60 min. a 37°C.
8. A seguir, a placa foi lavada, por 3 vezes, com tampão fosfato.
9. Adicionar a mistura substrato + cromógeno, água oxigenada + OPD (otofenilenodiamina) no volume de 100 µl (2 gotas) por cavidade utilizada.
10. Incubar à temperatura ambiente até o desenvolvimento de coloração amarela nos controles positivos.
11. Para parar a reação, adicionar 50 µl (1 gota) de ácido sulfúrico 2M a cada cavidade.
12. São consideradas positivas as amostras que apresentarem coloração.

#### **Princípio do teste:**

A estratégia de detecção dos anticorpos no soro de um paciente pelas metodologias de ELISA e Western Blot baseadas na reação desse anticorpo com um antígeno numa amostra, preparada de tal forma que esse antígeno esteja imobilizado. Esse é o caso das. Na figura 13 temos os esquemas das várias estratégias. O ensaio direto é um ensaio para detecção de antígeno. Os ensaios indireto e de captura são para detecção de anticorpos no soro dos pacientes. O que estamos aplicando para os ensaios desta prática é o ensaio indireto (indirect assay), em que os anticorpos que buscamos detectar são os anticorpos primários desse esquema (primary antibody).

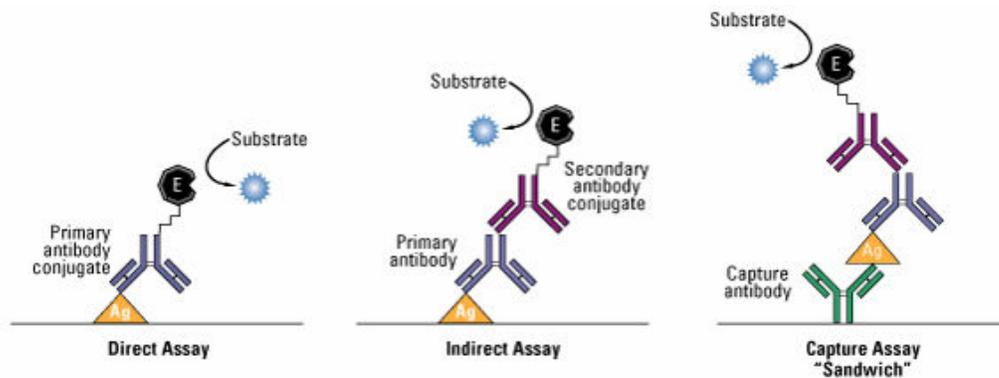
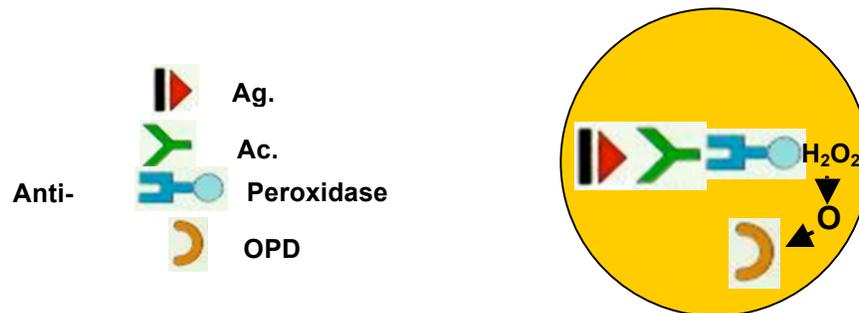


Fig 13

Detalhando para o ensaio indireto que estamos aplicando:



A enzima utilizada é a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário, que ao ser retida na amostra cliva o substrato água oxigenada, liberando oxigênio (tem um elétron desapareado) que reage com o indicador OPD (incolor) alterando a cor da solução. À Fig 14 temos o resultado de um ensaio real em microplaca utilizada na rotina laboratorial.



Fig 14

Esquema dos resultados obtidos em nosso teste:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

A, C, E e G antígenos virais. B, D, F e H antígenos celulares.  
 C+ Controle Positivo; C- Controle Negativo; 31 a 36 Amostras  
 31 e 35 negativas – não reativas  
 32 e 36 positivas - reação com antígenos virais  
 33 e 34 indeterminadas – reação com antígenos virais e celulares

As amostras positivas e indeterminadas no ELISA devem seguir para o teste de Western blot, um ensaio mais específico.

#### Determinação de anticorpos anti-HIV através da reação de Western blot.

A técnica de Western blot tem sido utilizada na caracterização do perfil antigênico do HIV e na descrição da resposta imune para este vírus em pessoas expostas ou infectadas. Devido a seu alto custo mas grande sensibilidade, é comumente utilizada apenas como teste confirmatório, sendo o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado rotineiramente como teste de triagem.

O princípio da reação é o mesmo do ensaio imunoenzimático, mas na reação de Western blot as proteínas virais são separadas pela sua massa (kDa) e fixadas em fitas. O preparo destas fitas, contendo as proteínas virais, é feito pelas indústrias produtoras de kits de diagnóstico. No laboratório clínico a reação é feita a partir da adição do soro do paciente.

Preparo das fitas:

1. O HIV é cultivado da linhagem celular H9 de linfócitos T. O vírus parcialmente purificado é inativado por tratamento com psoralen e luz ultravioleta e rompido pela ação de detergente.
2. Os extratos proteicos são aplicados num gel de SDS-poliacrilamida.
3. As proteínas virais são separadas de acordo com o peso molecular, através de eletroforese .
4. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose ou nylon, em cuba de transferência, por aplicação de uma corrente elétrica.
5. A membrana é então lavada, bloqueada (com proteínas, ex: leite, para minimizar a ligação inespecífica de imunoglobulinas), cortada em fitas e acondicionada.

A figura 15 mostra o esquema geral de um Western blot. Para a produção das fitas é feito um gel preparativo com uma única canaleta.

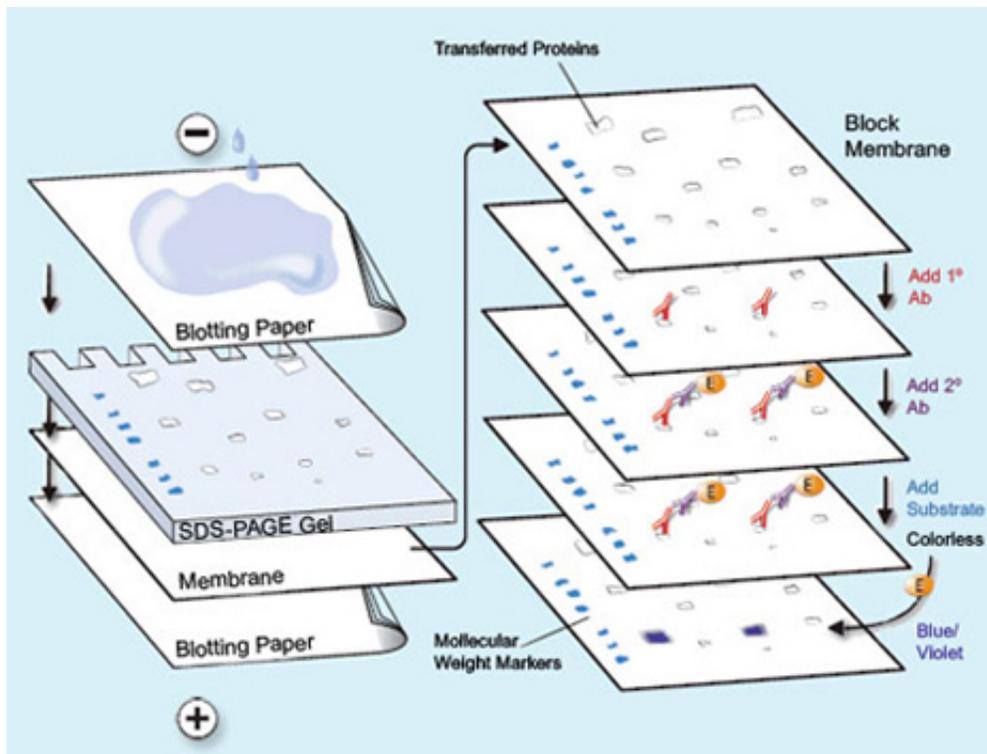
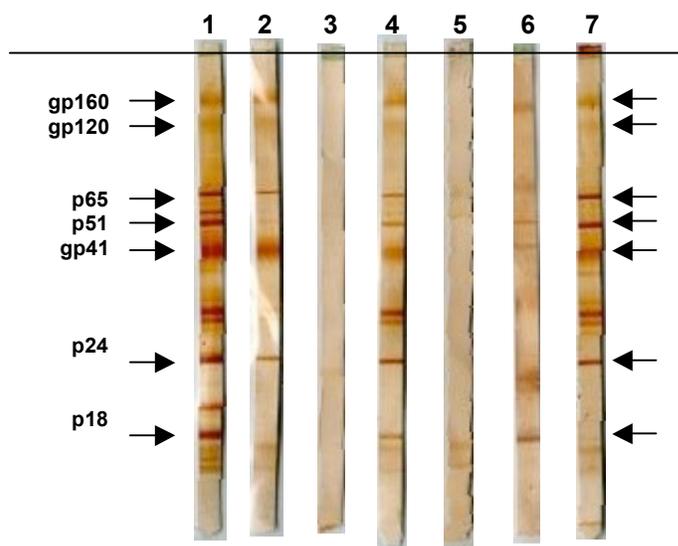


Fig 15

**No momento do teste:**

6. Para cada amostra de soro é utilizada uma fita em separado. As fitas de nitrocelulose são incubadas na presença do soro ou plasma dos pacientes, assim como, com os soros controles, por 2 hs a 37°C.
7. A seguir, as fitas são lavadas, por 3 vezes, com tampão fosfato contendo Tween 20.
8. Para detectar a presença dos anticorpos, é adicionado soro detector: soro de cabra anti IgG humana, conjugado à peroxidase e as fitas são incubadas por 30 min. a 37°C, e lavadas.
9. A reação é revelada com solução de substrato: tampão citrato contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4-cloro-1-naftol (cromógeno), por 10 a 15 minutos à temperatura ambiente, e lavadas com água.
10. Para leitura da reação é feita análise das bandas proteicas reveladas, e a presença ou ausência de anticorpos para HIV é determinada pela comparação de cada fita de nitrocelulose teste com os padrões de bandas dos controles positivos. Cada banda visualizada na fita teste deve ser relacionada com um peso molecular das proteínas virais, baseando-se em sua posição e por comparação com a fita contendo o controle positivo altamente reativo (forte).

**Resultados do Western-blot:**



1 – Controle Positivo Forte; 2- Controle Positivo Fraco; 3 – Controle Negativo;  
 4 – Amostra 32; 5 – Amostra 33; 6 – Amostra 34; 7- Amostra 36

Padrão observado	Resultado
Nenhuma banda presente	Negativo
Uma bandas presente em gp41 ou gp120/160, e a banda p24 presente. Normalmente gp 120/160 e gp 41 apresentam-se difusas.	Positivo para HIV-1
Bandas presentes com padrão diferente do esperado	Indeterminado

**Amostras 32 e 36, positividade confirmada.**

**Amostra 33, reação inespecífica confirmada, o soro do paciente deve ter anticorpos que reconhecem antígenos celulares no teste de ELISA.**

**Amostra 34, tem reatividade contra algumas bandas na altura das glicoproteínas, mas não reage com p24. O resultado inespecífico está confirmado. Além de apresentar reatividade com antígenos celulares no ELISA, podem haver anticorpos resultantes de infecção com outro retrovírus.**

**Conclusão: tanto os pacientes positivos quanto os indeterminados devem ser chamados para nova coleta de sangue. Os testes devem ser repetidos para confirmação de positividade/indeterminação antes de soltar os resultados. Análises mais detalhadas devem ser feitas posteriormente no caso dos indeterminados.**