

Técnicas Laboratoriais Aplicadas em Virologia :

Diagnóstico e Acompanhamento Clínico



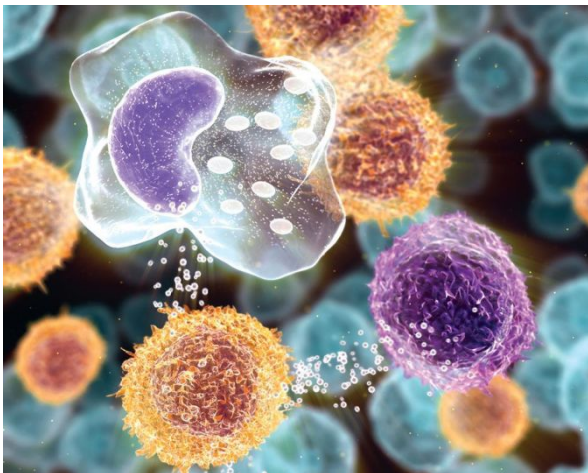
Tatiane Assone
LIM56/IMT/FMUSP

Setembro/ 2021

Principais Metodologias

Técnicas Imunológicas

- ELISA
- IMUNOBLOTTING (WESTERN BLOTTING)
- IMUNOCROMATOGRAFIA (TESTE RÁPIDO)
- CITOMETRIA DE FLUXO
- CULTURA CELULAR

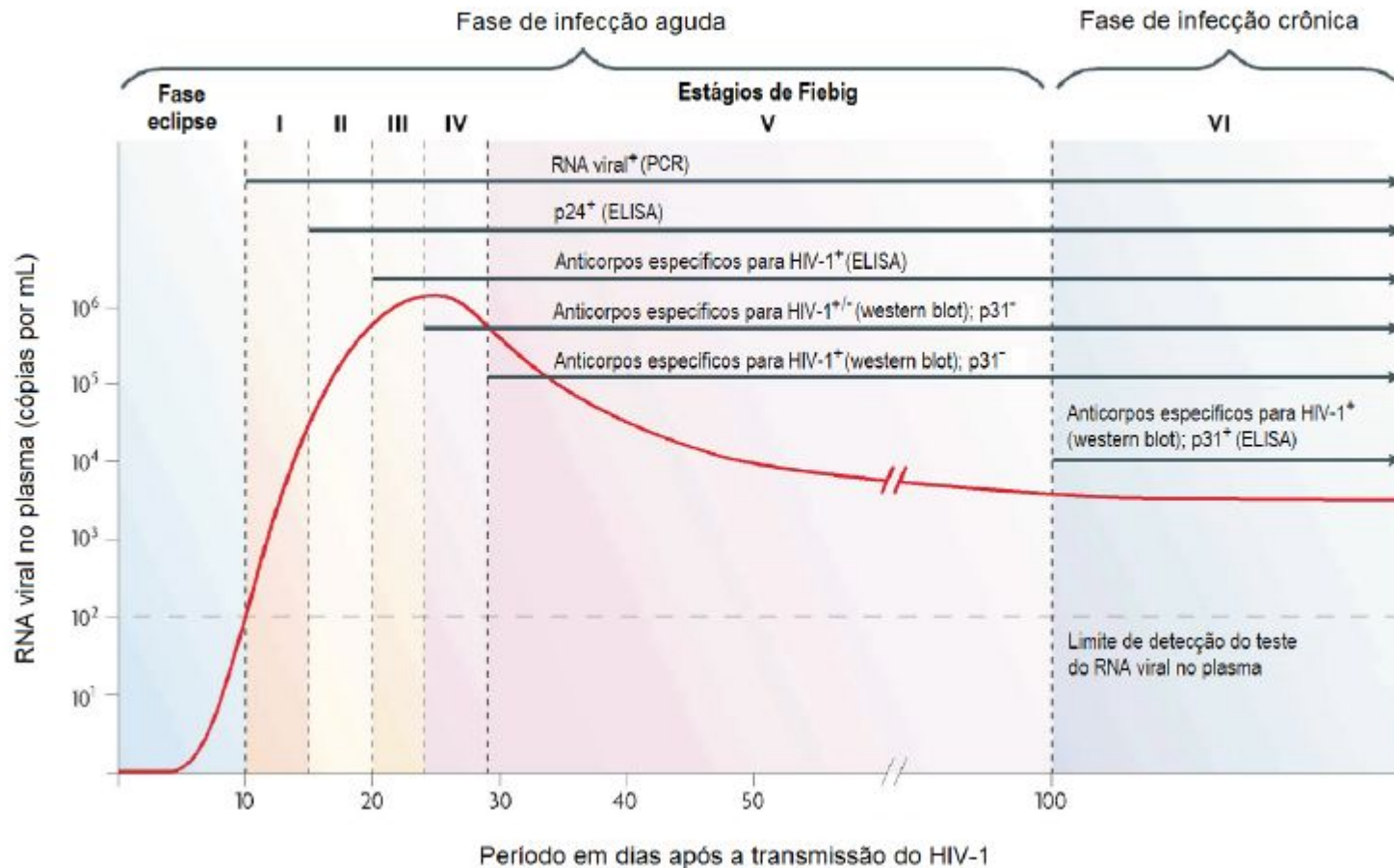


Técnicas Moleculares

- PCR CONVENCIONAL
- NAT
- PCR EM TEMPO REAL
- SEQUENCIAMENTO



Exemplo



DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Ensaio imunoenzimáticos

PRINCÍPIO: ligação Anticorpo/Antígeno com o uso de uma enzima para geração de um sinal

EXEMPLOS:

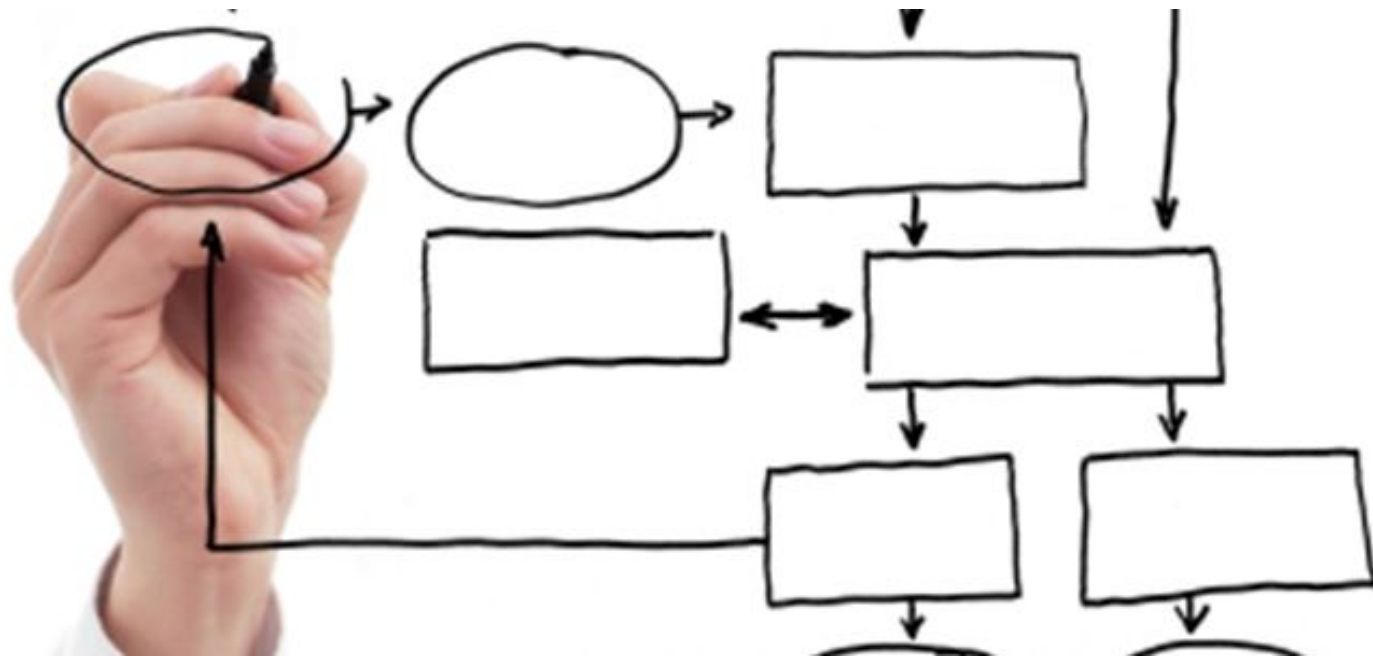
ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IMUNOBLOTTING

WESTERN BLOTTING (proteínas)

(*Southern* - DNA / *Northern* - RNA)

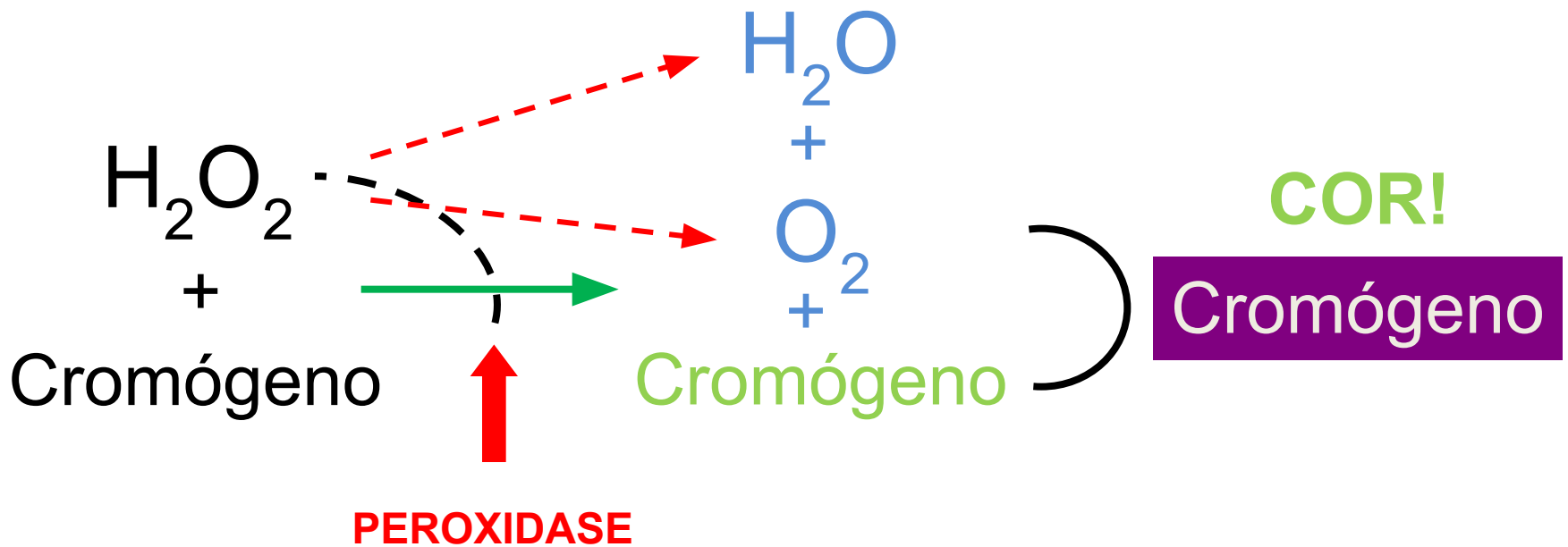


Metodologías Utilizadas para Diagnóstico

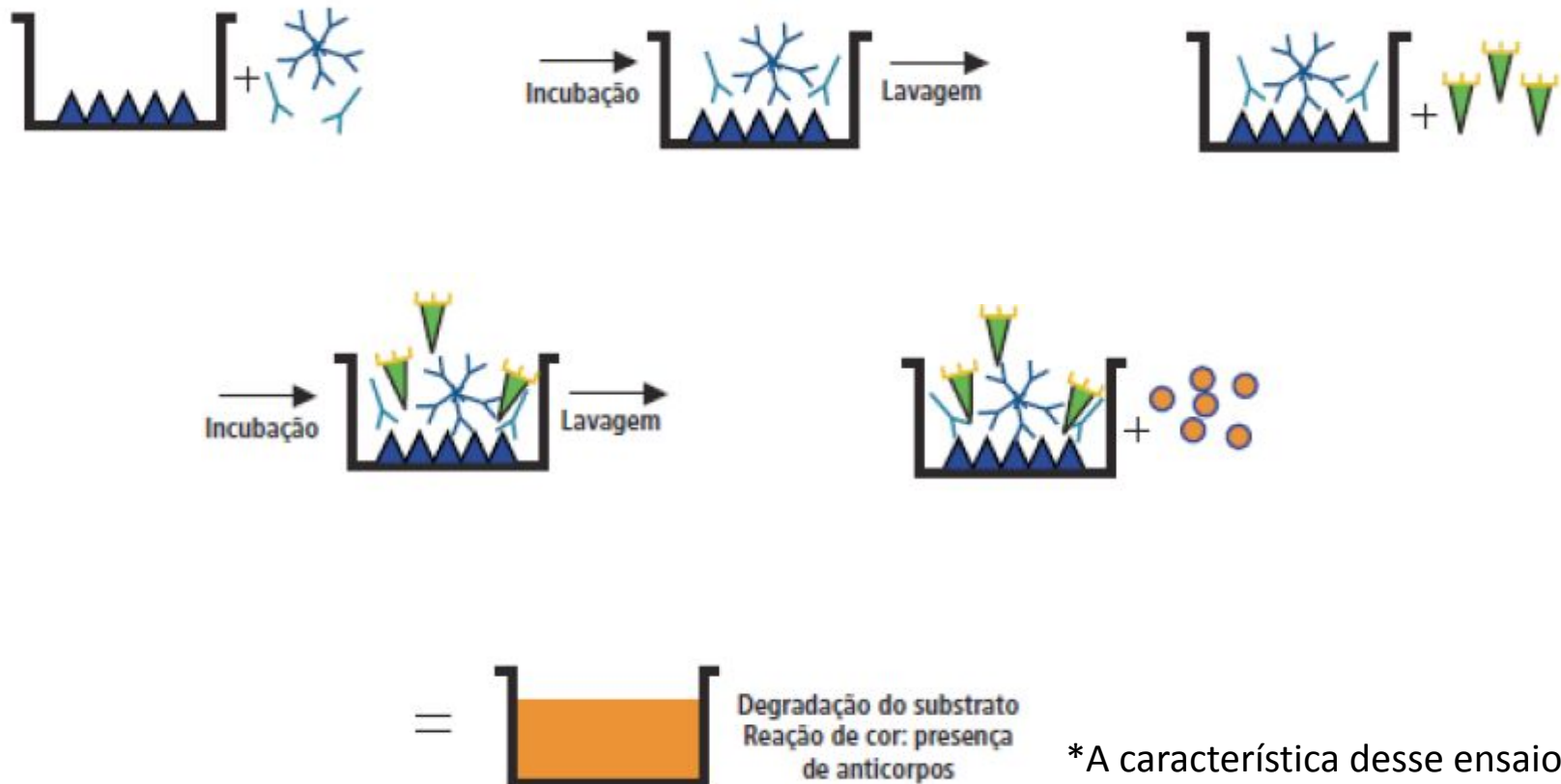
ELISA

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Cromógenos! Como funcionam?

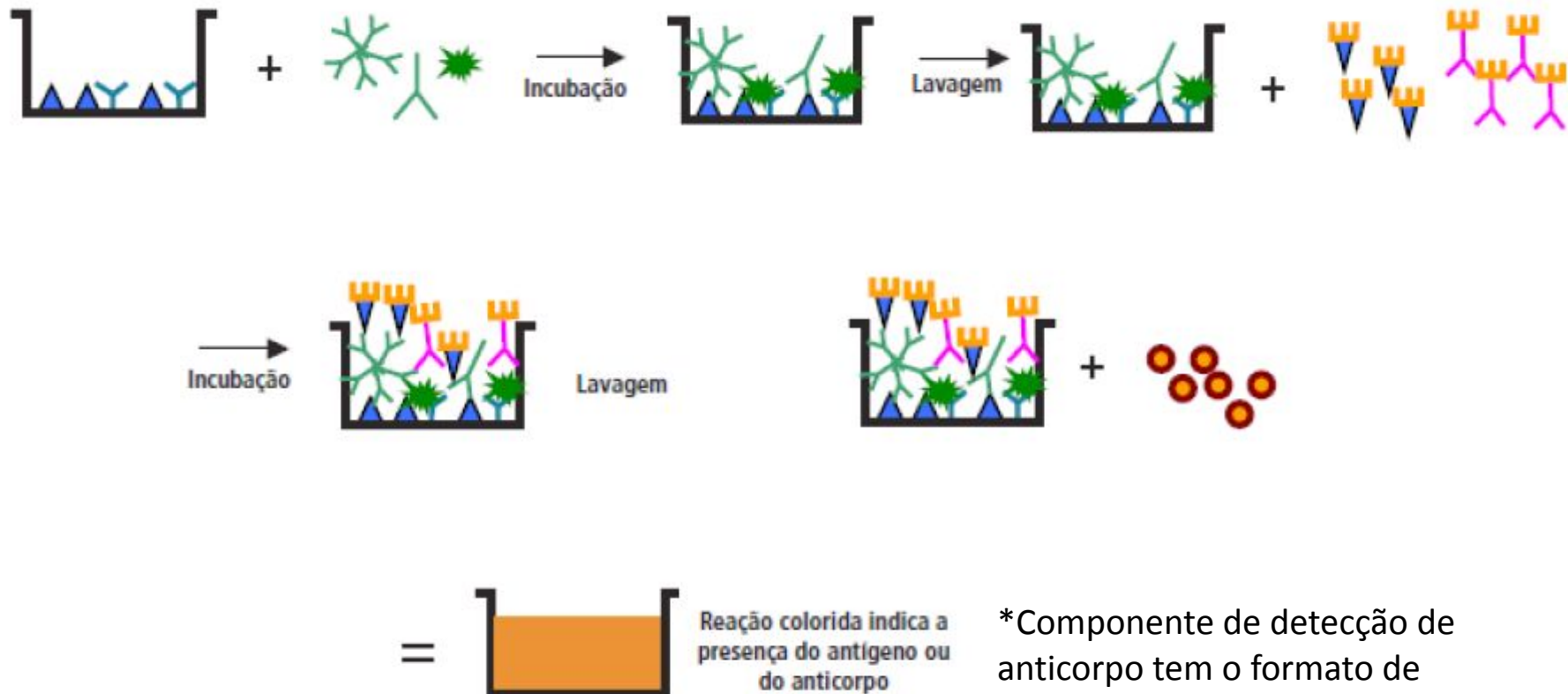


ELISA INDIRETO 3ª Geração



*A característica desse ensaio é utilizar antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos tanto na fase sólida quanto sob a forma de conjugado

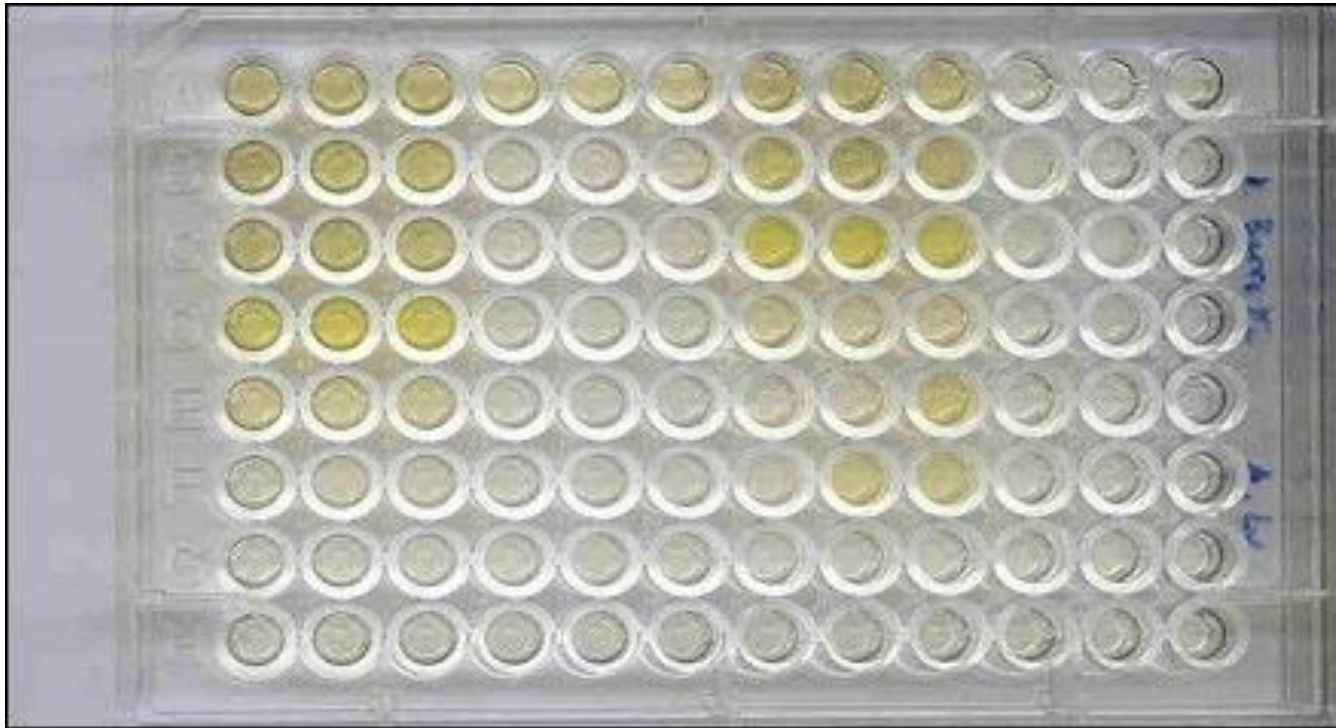
ELISA INDIRETO 4ª Geração

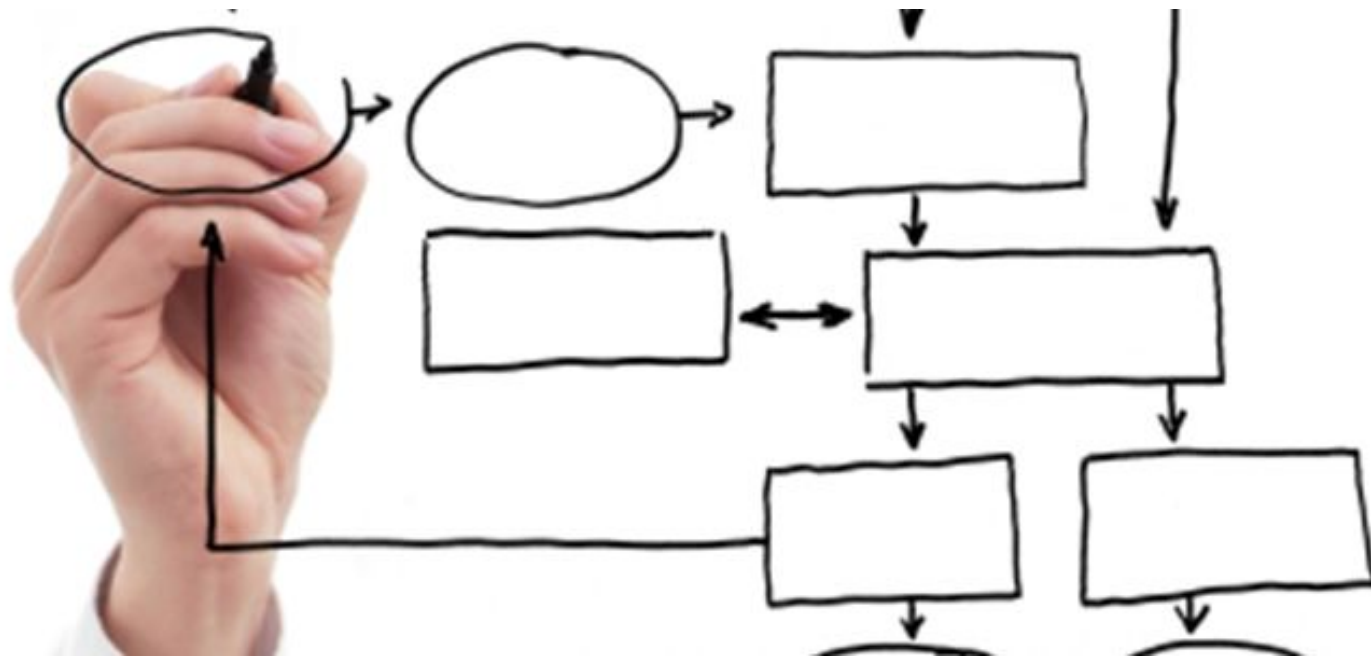


*Componente de detecção de anticorpo tem o formato de “sanduíche”; portanto, detecta todas as classes de imunoglobulinas contra proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos (Ac monoclonal)

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

ELISA – Como fica o resultado?





Metodologías Utilizadas para Diagnóstico

WESTERN BLOTT

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Outro teste imunoenzimático – *Western blot*

PRINCÍPIO: ligação Anticorpo/Antígeno com o uso de uma enzima para geração de um sinal

ESQUEMA: mais utilizado para detecção de Ac
(INDIRETO)

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Suporte – membrana de nitrocelulose

Aonde começa esta história?

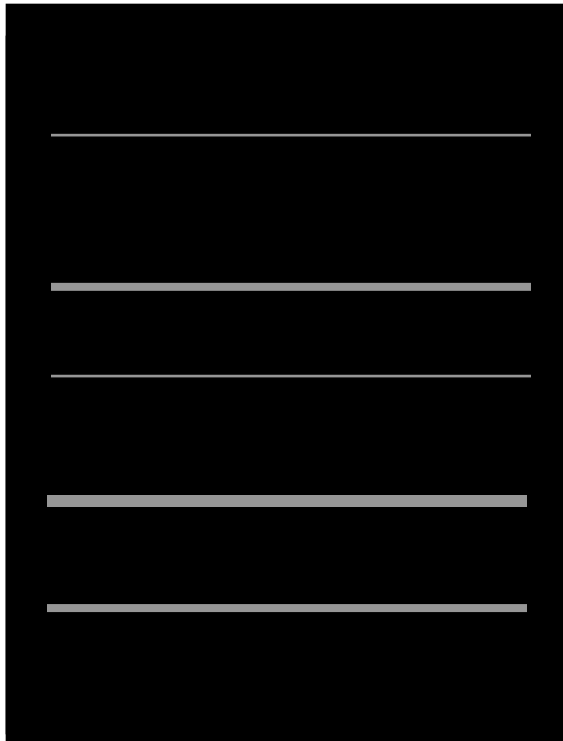
Em uma eletroforese!

Separação de proteínas de acordo com sua carga elétrica (peso molecular)!

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Eletroforese

Corrente elétrica!



**Bandas!
Proteínas
separadas!**

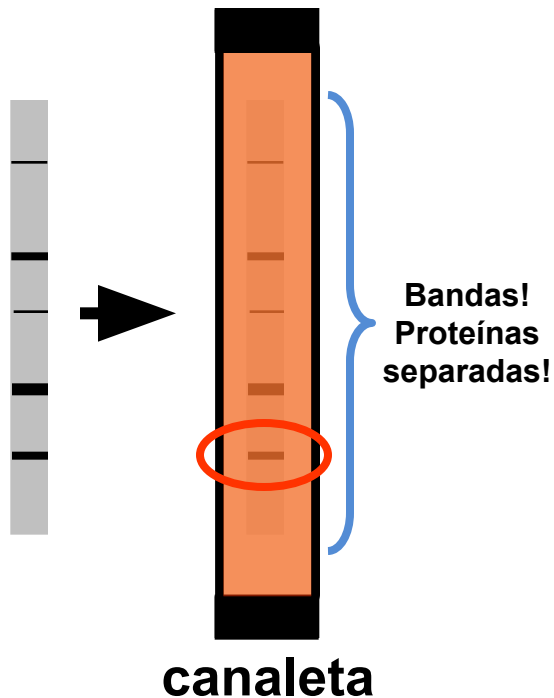
1- O antígeno é colocado no gel de acrilamida (p.ex. vírus HIV)

2- Aplica-se o campo Elétrico (proteínas migram)

3- Formam-se bandas (cada banda proteínas do mesmo tamanho ou peso molecular)

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Western blotting



1- Suporte: fitas de nitrocelulose com as proteínas do antígeno (p.ex. vírus HIV)

2- Amostra: captura de Ac anti-cada proteína do antígeno (p.ex. anti-HIV)

3- Ac de detecção (conjugado): Ac anti-Ac humano (p.ex. anti-IgG) conjugado a enzima

DETECÇÃO?

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

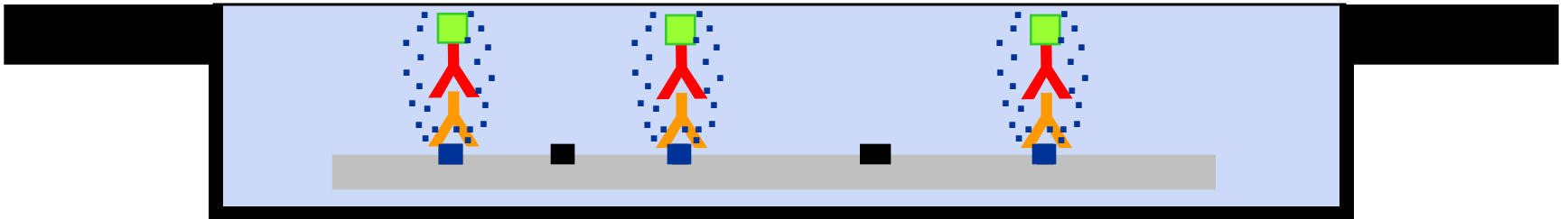
Western blot - revelando!

Amostra: captura de Ac anti-cada proteína do antígeno

Ac de detecção (conjugado): Ac anti-Ac humano conjugado a enzima

CROMÓGENO (SUBSTRATO)

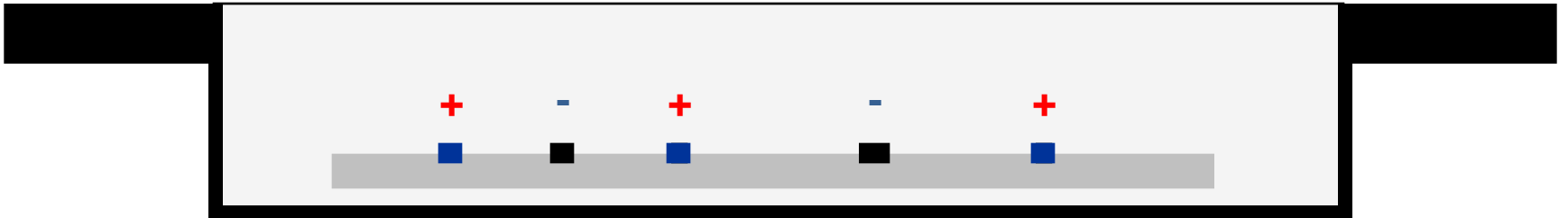
precipita ao ser consumido!



DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

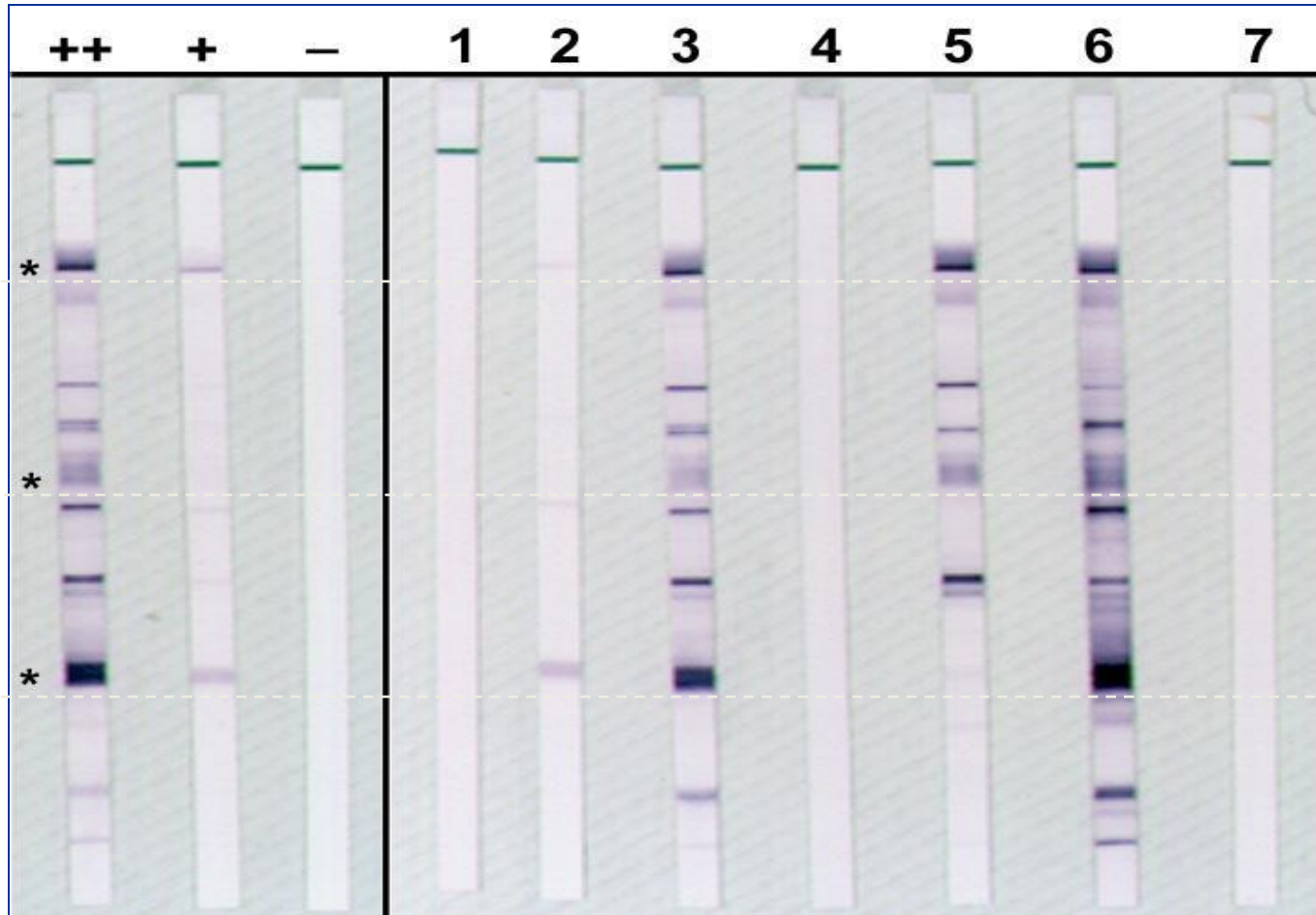
RESULTADO!

BANDAS CORADAS = AC ESPECÍFICO NA AMOSTRA

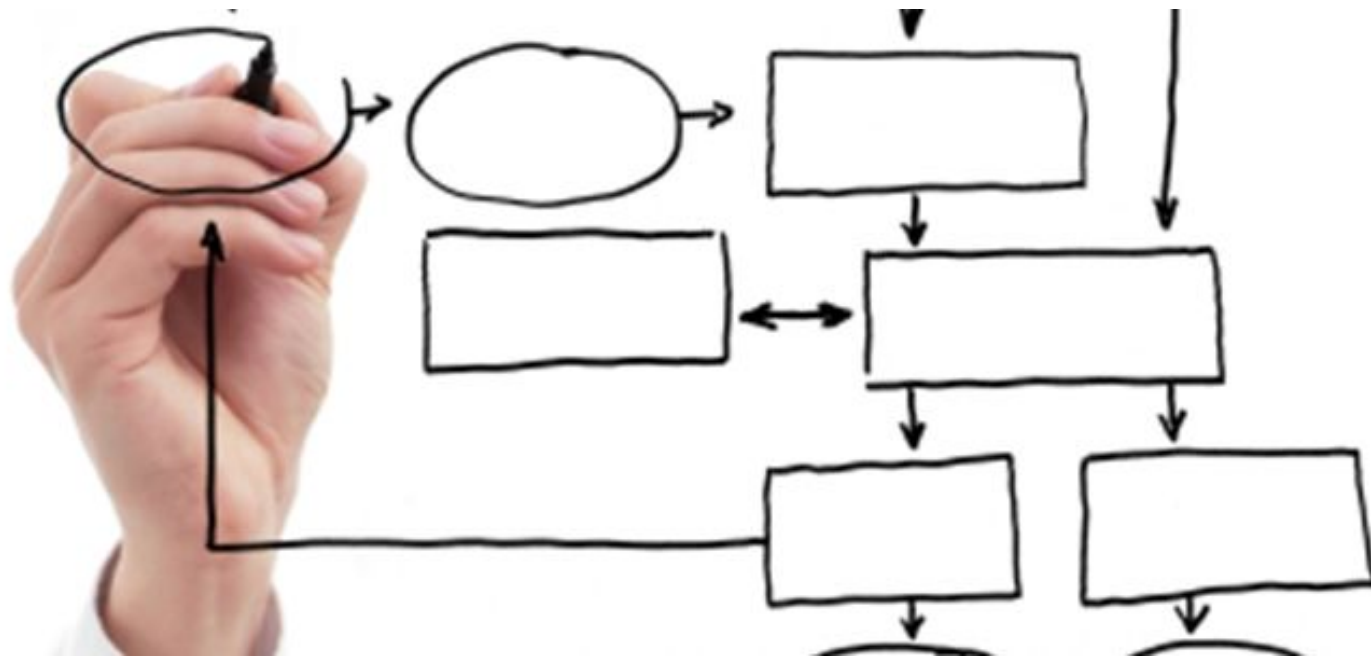


DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Western blot – Exemplo (HIV)!



* = bandas necessárias para resultado positivo



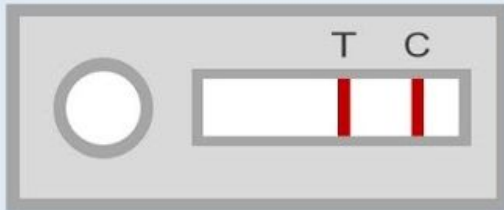
Metodologias Utilizadas para Diagnóstico

IMUNOCROMATOGRAFIA

TESTE RÁPIDO

Metodologia

TESTE RÁPIDO

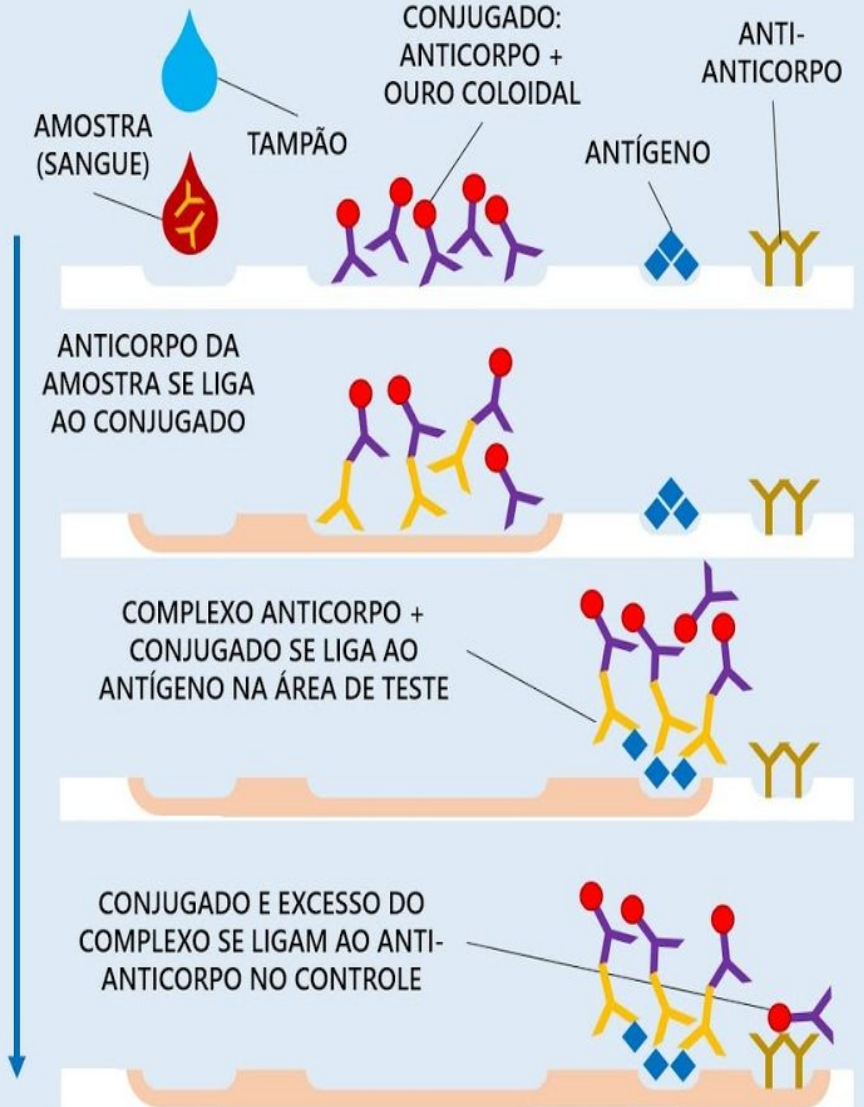


O TESTE RÁPIDO É UM TESTE DE IMUNOCROMATOGRAFIA QUE PERMITE DETECTAR RAPIDAMENTE A PRESENÇA DO ANTÍGENO OU ANTICORPO NA AMOSTRA.

O TESTE RÁPIDO É PENSADO NA FACILIDADE DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE PARA COLETA EM CAMPO, ALÉM DE SER FÁCIL DE USAR, DISPENSANDO TÉCNICAS COMPLICADAS OU VÁRIOS REAGENTES.

HÁ VÁRIOS TIPOS DE TESTES RÁPIDOS ALÉM DO FLUXO LATERAL: DUPLA MIGRAÇÃO (DPP); IMUNOCONCENTRAÇÃO; FASE SÓLIDA. CADA UM ADAPTADO A UM TIPO DE PESQUISA.

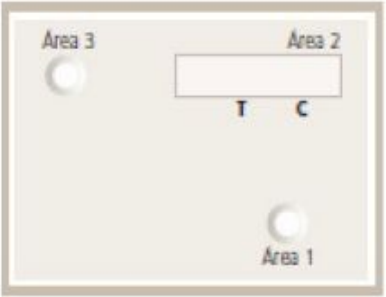
IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL



Revelação



A



B



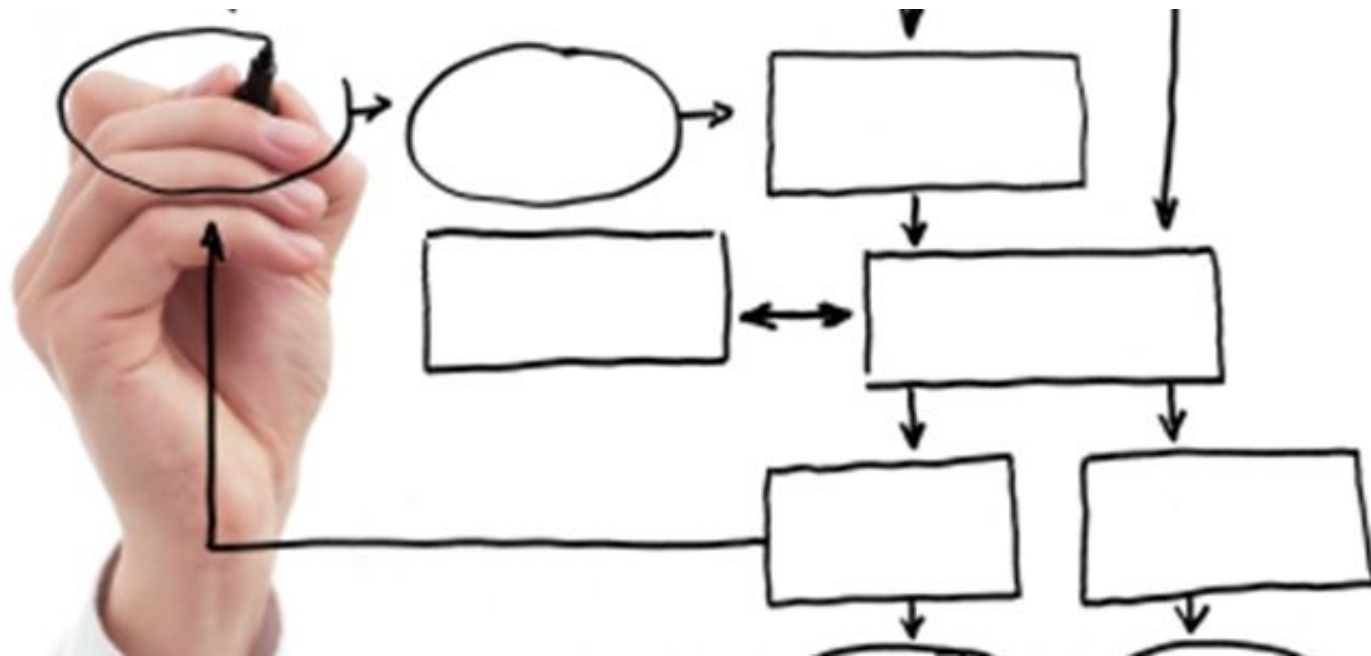
C

INTERPRETAÇÃO

POSITIVO

NEGATIVO

INVÁLIDO (NECESSÁRIO REPETIÇÃO)

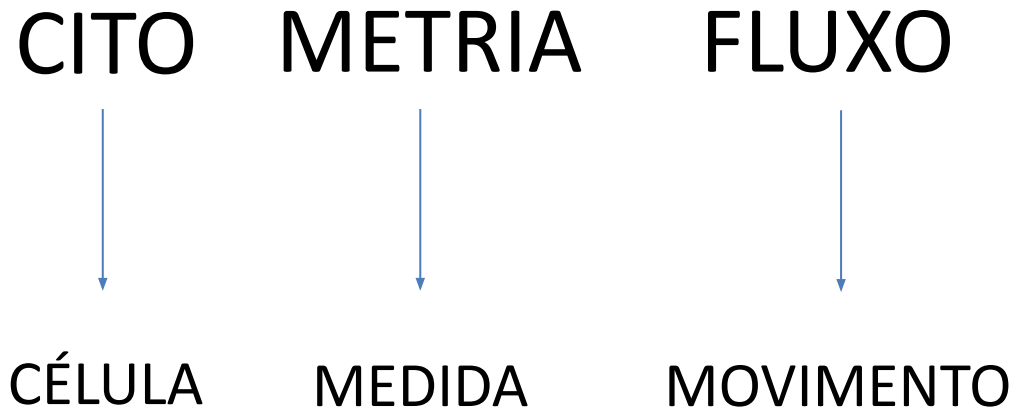


Metodologias Aplicadas no Acompanhamento

CITOMETRIA DE FLUXO

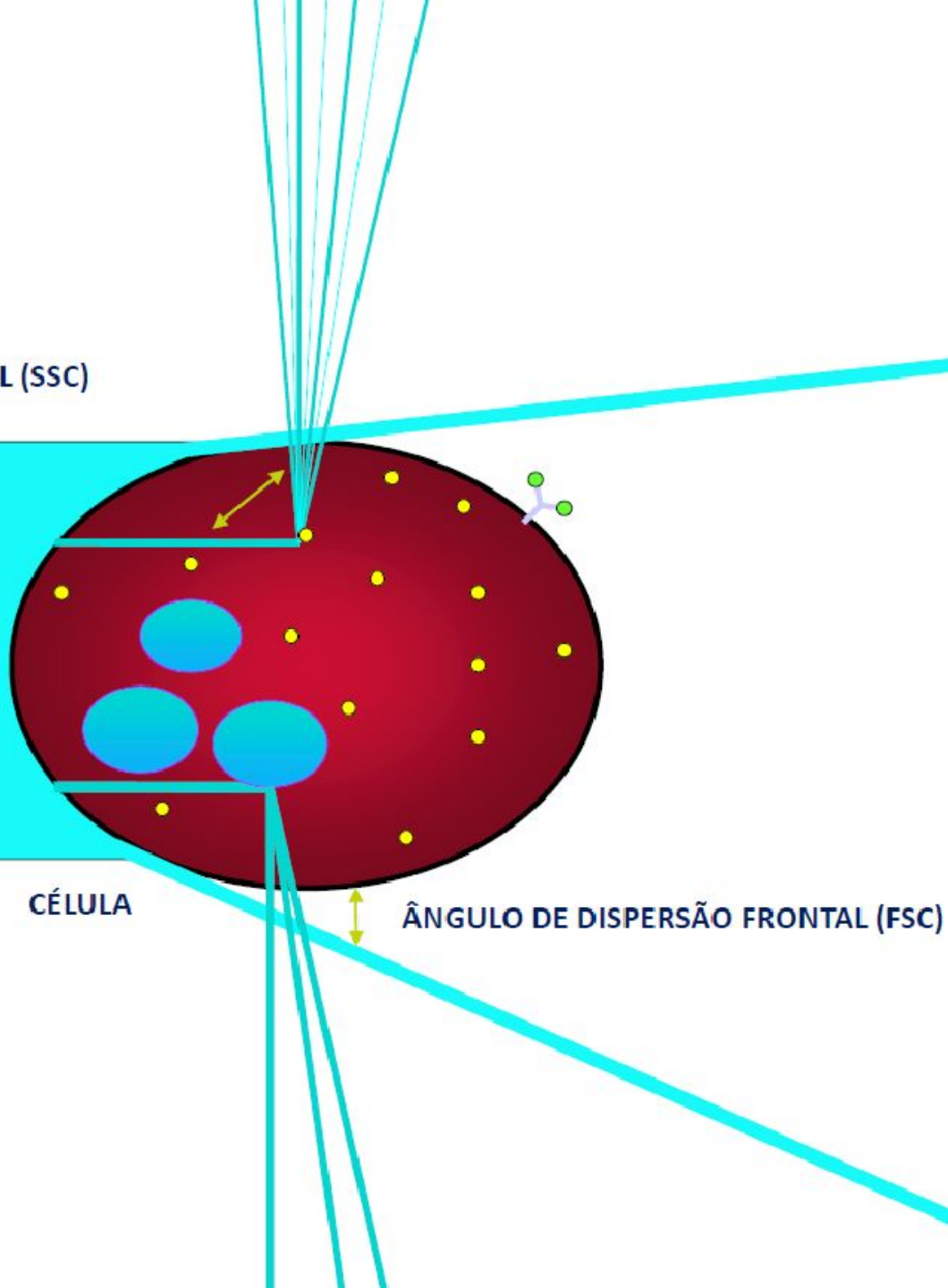
Princípios Básicos

Técnica citológica avançada, utilizada para contar, analisar e classificar partículas microscópicas em suspensão.



ÂNGULO DE DISPERSÃO LATERAL (SSC)

LASER



Método de Análise

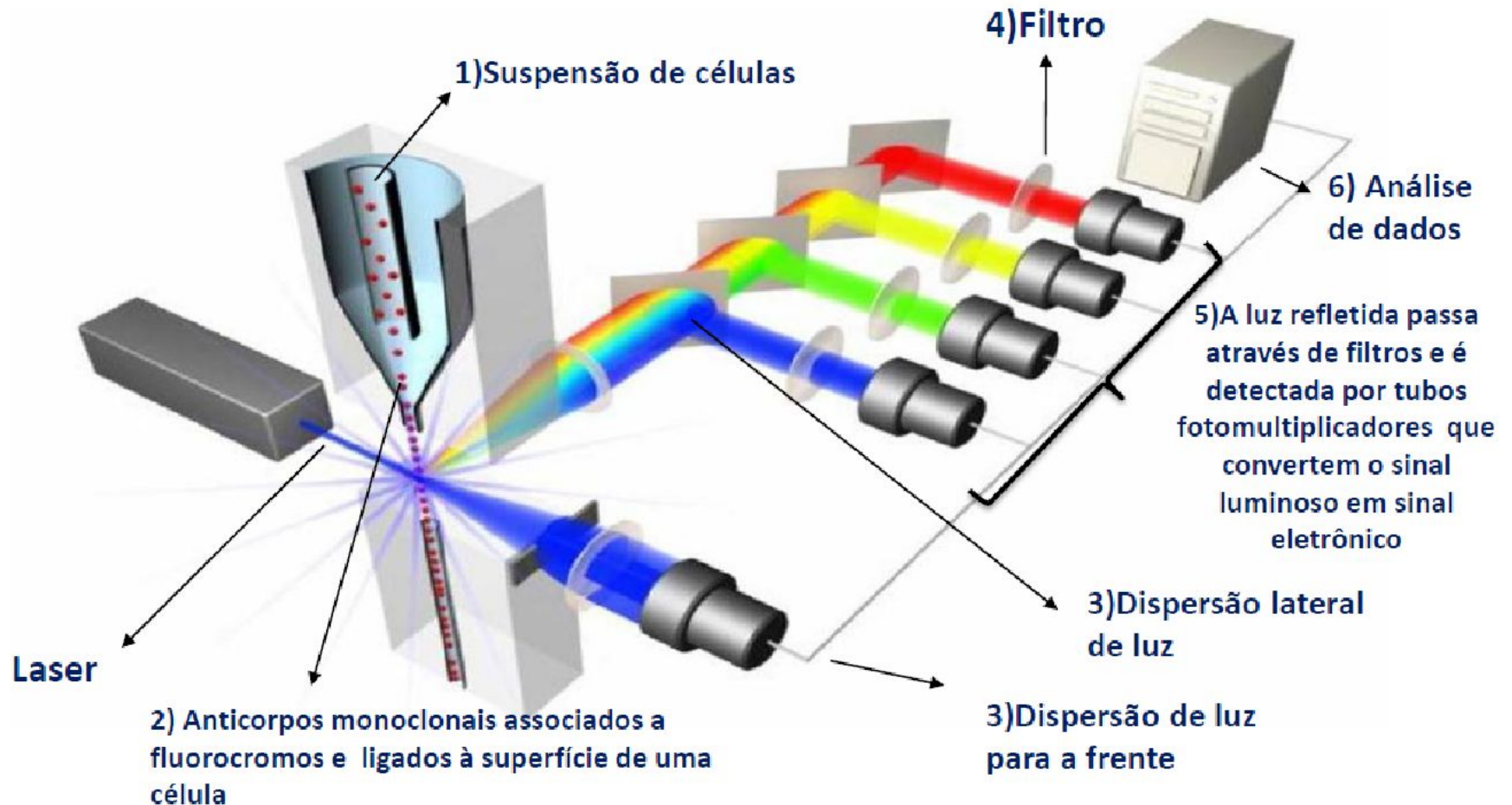
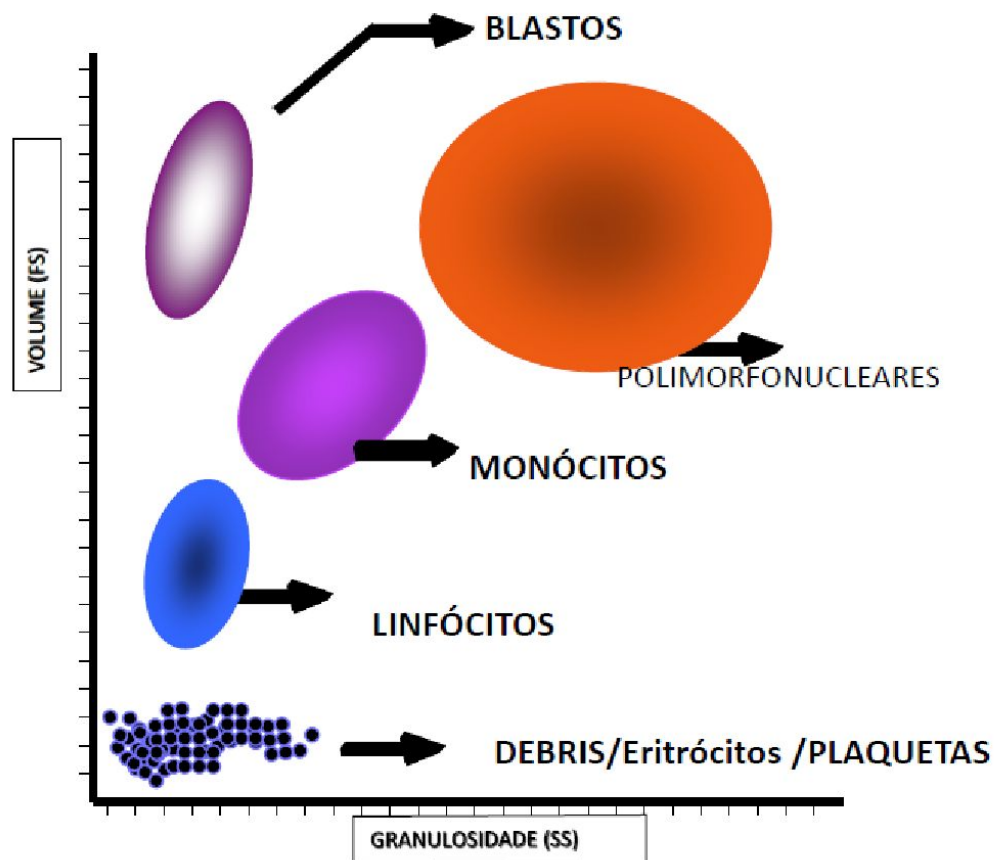
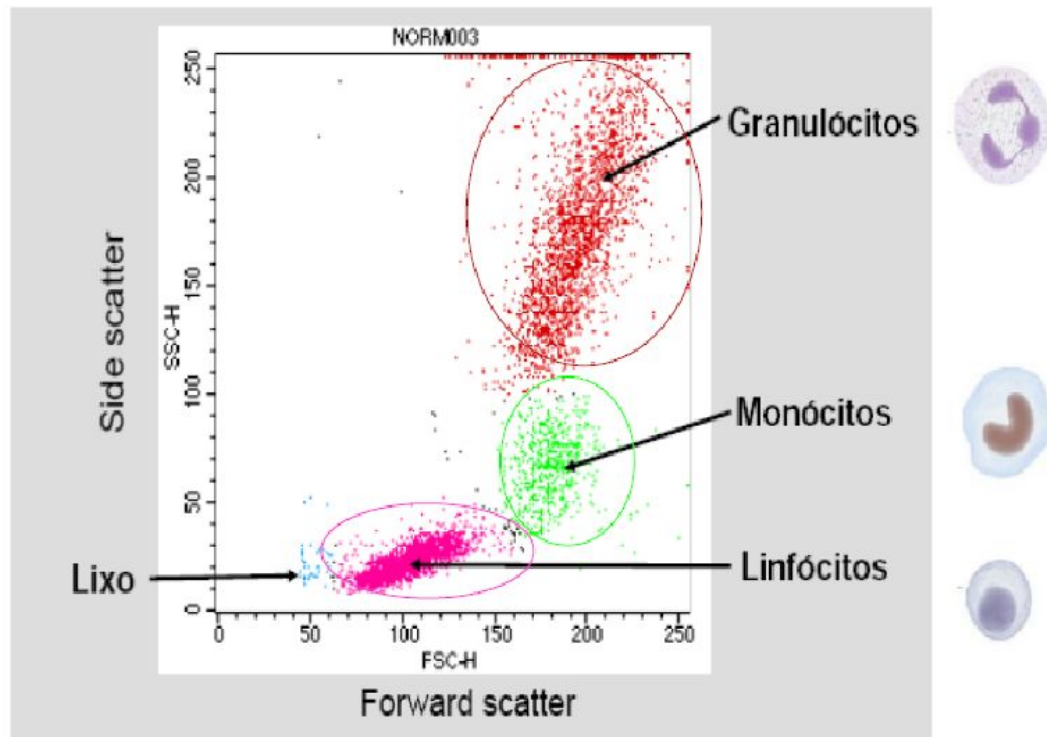


Gráfico de Dispersão



Interpretação dos Resultados



Cada ponto significa uma célula identificada pelo citômetro.

Estão divididas pela dispersão frontal (forward) – tamanho da célula - horizontalmente

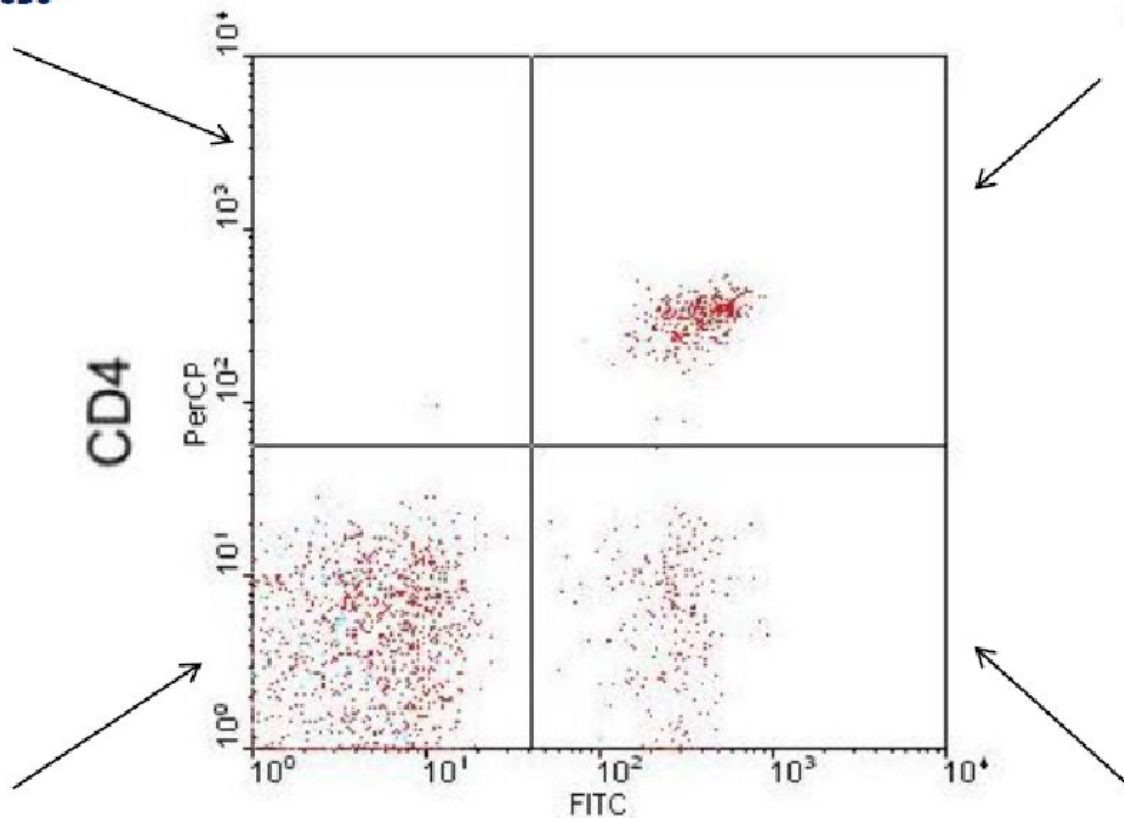
E também pela dispersão lateral (side) - granulação e complexidade – verticalmente

Os círculos indica células que pertencem a um grupo de tamanho e complexidade próximos

Gráfico de análise de Leucócitos (com fluorescência)

Neste quadrante estão as células CD4+ e CD3-

Neste quadrante estão as células CD4+ e CD3+ (linfócitos Th)



Neste quadrante estão as células CD4- e CD3- (células que não linfócitos)

Neste quadrante estão as células CD4- e CD3+ (outros linfócitos que não Th)

Marcadores

CD3- presente no citoplasma e posteriormente na membrana de 95% dos timócitos.

CD4- 55% a 65% das células T periféricas maduras, especialmente no subtipo auxiliar, mas também em monócitos, macrófagos e células dendríticas

CD8- 25% a 35% das células T maduras do subtipo citotóxica.

CD19- presente em mais de 95% das células B.

CD20- assim como o CD19 está presente em todas as células B maduras do tecido linfóide e sangue periférico.

CD45- expresso quase exclusivamente em células hematopoiéticas podendo apresentar as formas : CD45RA ou CD45RO.

CD56- marcador de NK, não está expresso em células B, monócitos ou granulócitos.

Caso Clínico:

Dr. (a): [REDACTED] - CRM [REDACTED]

Coletado em: 07/01/2019 07:44

Resultado

IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T, B E NK, SANGUE

Valores de Referência

Metodo

Liberado em: 09/01/2019 08:42:57

Citometria de fluxo

Linfócitos T

CD45/CD3	:	68,79 %	1538 células/mm³	60-87% 605-2460 células/mm ³
CD45/CD3/CD4	:	44,59 %	997 células/mm³	32-61% 493-1666 células/mm ³
CD45/CD3/CD8	:	24,14 %	540 células/mm³	14-43% 224-1112 células/mm ³
CD45:			2236 células/mm³	990-3330 células/mm ³
Relação CD4/CD8	:		1,85	

Linfócitos B

CD45/CD19	:	04,15 %	93 células/mm³	5-20% 72-520 células/mm ³
-----------	---	---------	----------------------------------	--------------------------------------

Células NK

CD45/CD3-/CD16+CD56+	:	23,75 %	531 células/mm³	4-28% 73-654 células/mm ³
----------------------	---	---------	-----------------------------------	--------------------------------------

Valores de referência obtidos nos periódicos Haematologica 1999, 84:499-504; J Allergy Clin Immunol 2003,112: 973-980 e Mayo Clinic; 2009- Pediatrics Test Reference Values.

Valores de referência alterados a partir de 31/03/2014.

Vera Aparecida dos Santos

VERA APARECIDA DOS SANTOS
CRM 48204

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Cultura de linfócitos

**PRINCÍPIO: avaliar a capacidade proliferativa das células do paciente
(resposta ao antígeno)**

**UTILIZAÇÃO: avaliação da FUNÇÃO imune do paciente em resposta
a antígenos específicos ou estímulo policlonal**

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Cultura de linfócitos

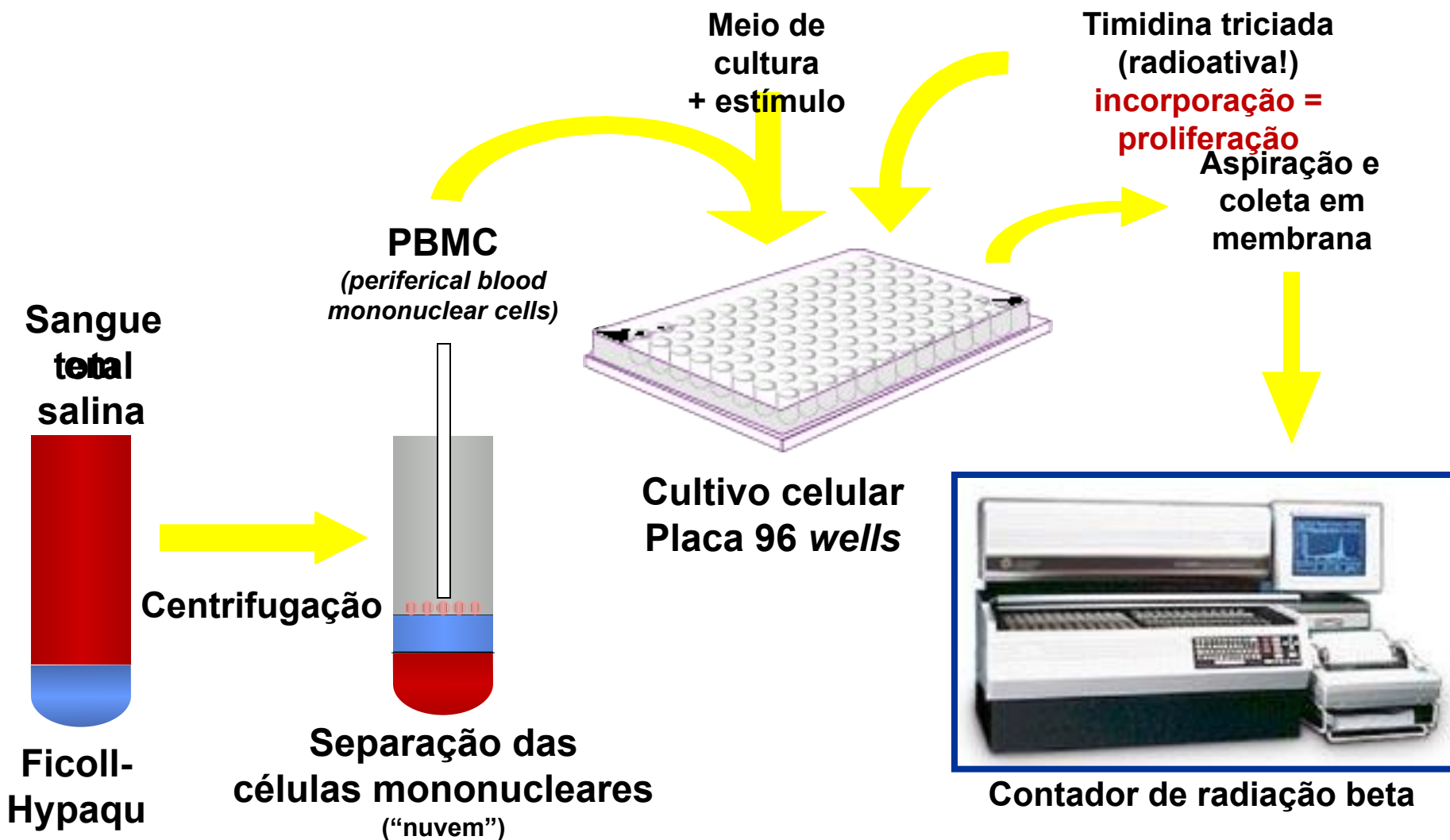
Suporte: placas de cultura (96 orifícios), meio de cultura adequado e estímulos (antígenos ou policlonais)

Antígenos: proteínas isoladas ou sintéticas de patógenos (p.ex. extrato de *Candida albicans* ou toxóide tetânico)

Policlonais: substâncias ou Ac capazes de ativar linfócitos independente de sua especificidade (p. ex. fitohemaglutinina ou OKT3 [anti-CD3])

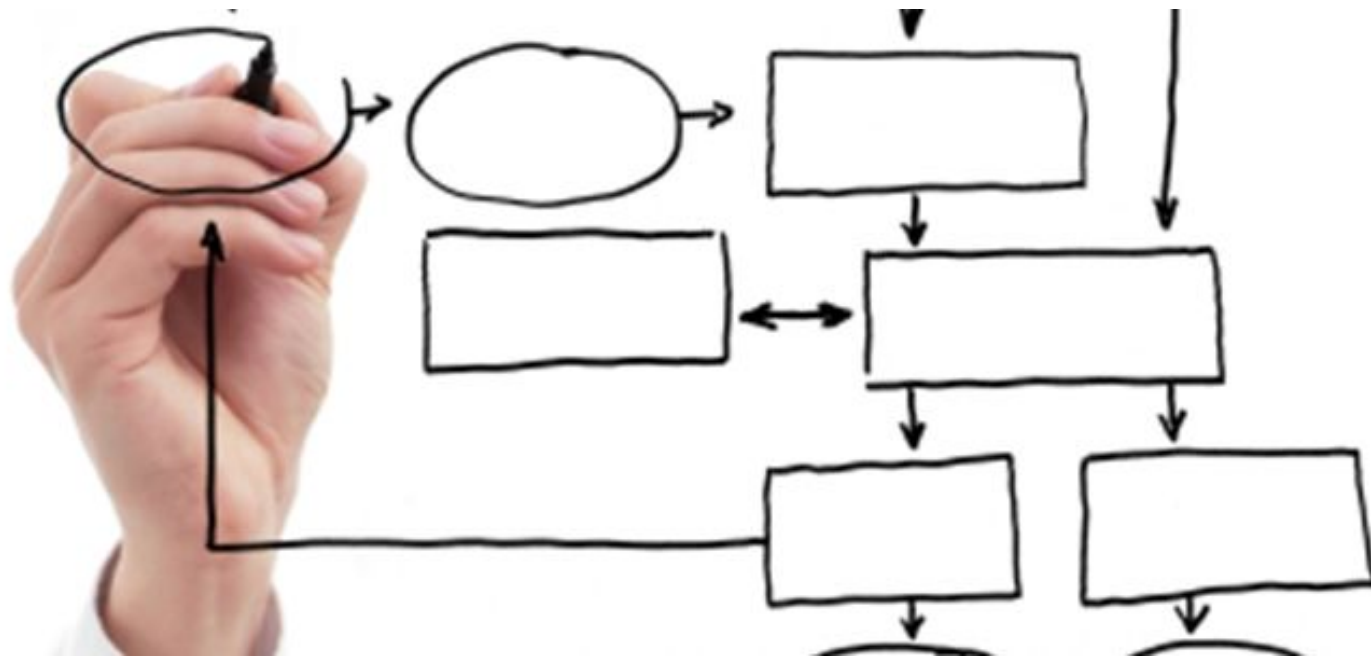
DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Cultura de linfócitos



Caso Clínico:

CULTURA DE LINFÓCITOS, SANGUE		Valores de Referência	Método
Coletado em: 07/01/2019 07:44			
Resultado			
CONTROLE - 3 DIAS			
		Resultado (em índice de estimulação - IE)	Incorporação
		Estímulo Percentil 5 Percentil 95	
		PHA 18,28 343,00	
		aCD3 15,62 219,30	
		PWM 8,42 107,40	
		Toxóide tetânico 3,66 37,7	
		CMA 3,35 91,40	
		CMV 3,04 56,6	
		Resultado (em delta cpm)	
		Estímulo Percentil 5 Percentil 95	
		PHA 23553 90875	
		aCD3 5461 79812	
		PWM 2312 65468	
		Toxóide tetânico 464 31405	
		CMA 436 44180	
		CMV 674 37137	
BASAL	421 cpm		
*PHA	19.208 cpm		
I.E	45,6 IE PHA		
DELTA CPM	18,78/ delta cpm PHA		
*aCD3	13.088 cpm		
I.E	31,1 IE a CD3		
DELTA CPM	12,667 delta cpm a CD3		
PACIENTE - 3 DIAS			
BASAL	9.976 cpm		
*PHA	3.682 cpm		
I.E	0,4 IE PHA		
DELTA CPM	- 6.294 delta cpm PHA		
*aCD3	5.602 cpm		
I.E	0,6 IE a CD3		
DELTA CPM	- 4.374 delta cpm a CD3		
<p>Legenda PHA: Fitohemaglutinina I.E: Índice de Estimulação DELTA CPM: Estimulação (-) basal aCD3: Anti-CD3</p>			



Metodologías Utilizadas para Diagnóstico

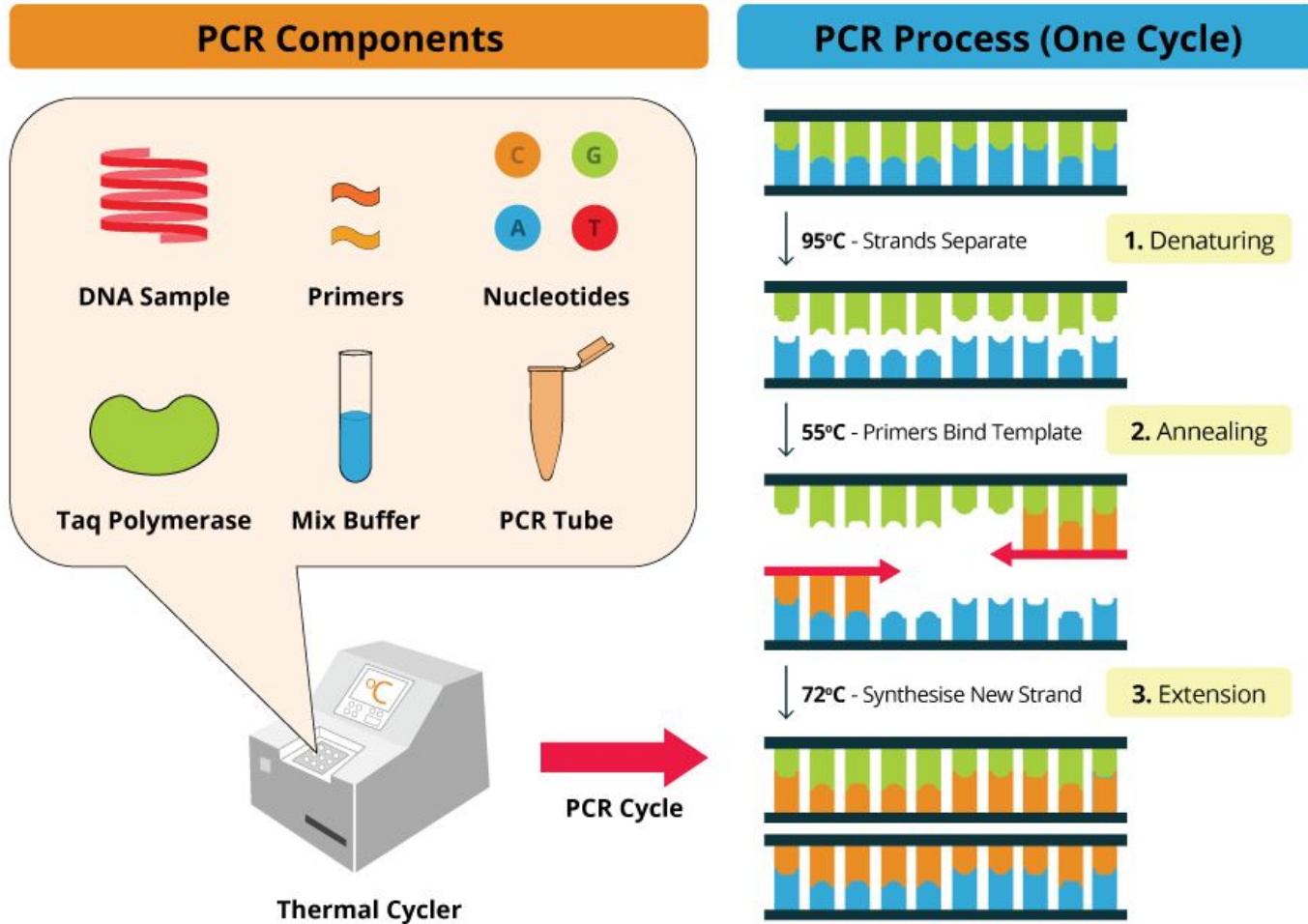
PCR CONVENCIONAL

Introdução

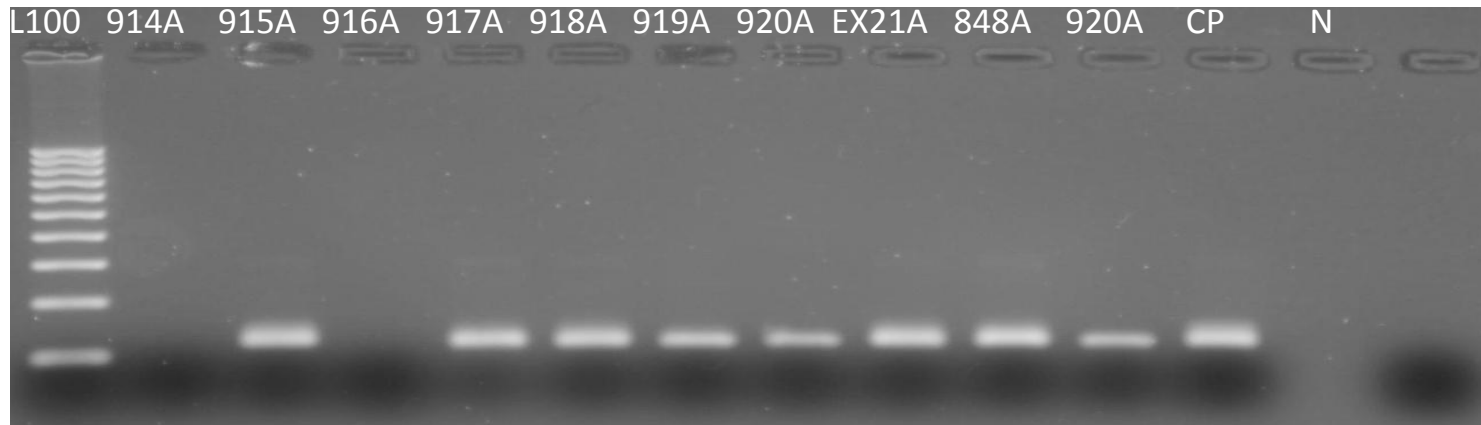
- uma das técnicas mais comuns utilizadas (laboratórios de pesquisas médicas e biológicas) para diversas tarefas
- método muito sensível de análise



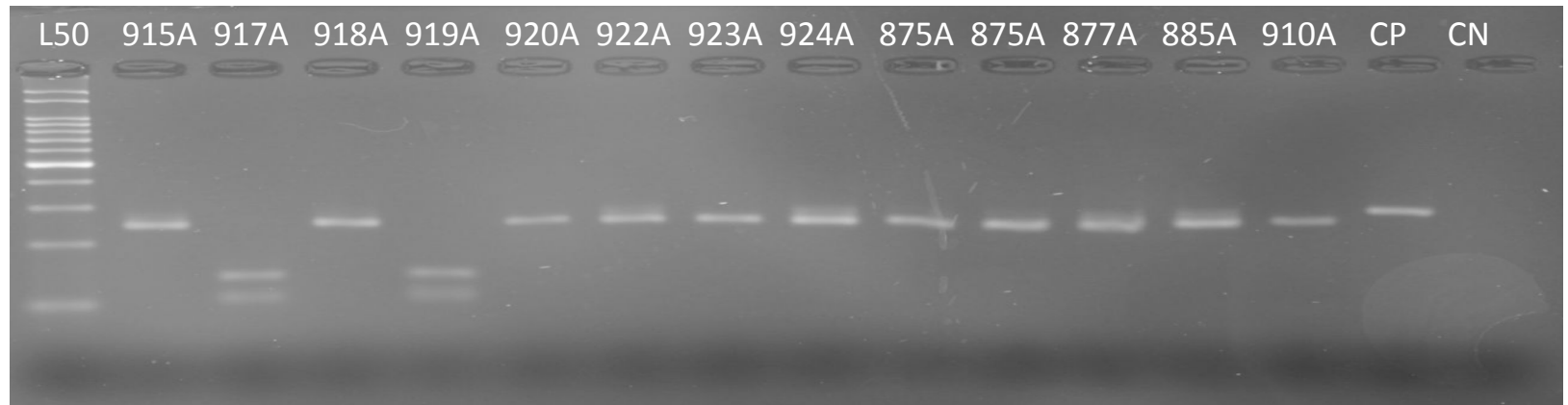
Principio



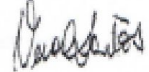
Exemplo : PCR para HTLV



Diferenciação e confirmação de infecção pelo HTLV-1 ou HTLV-2 por RFLP

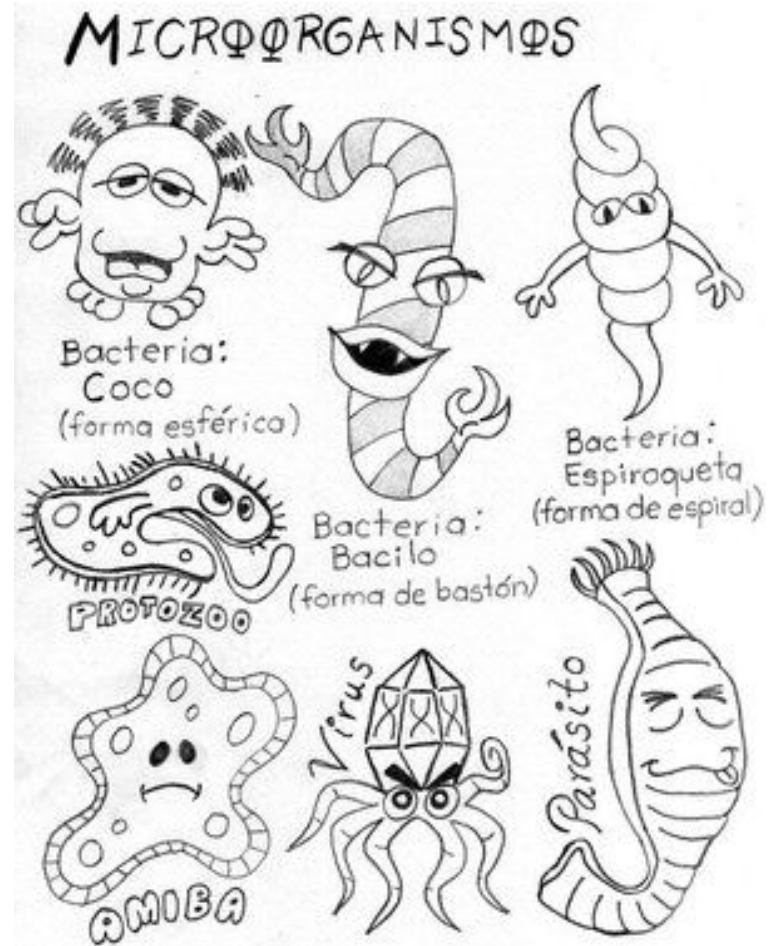


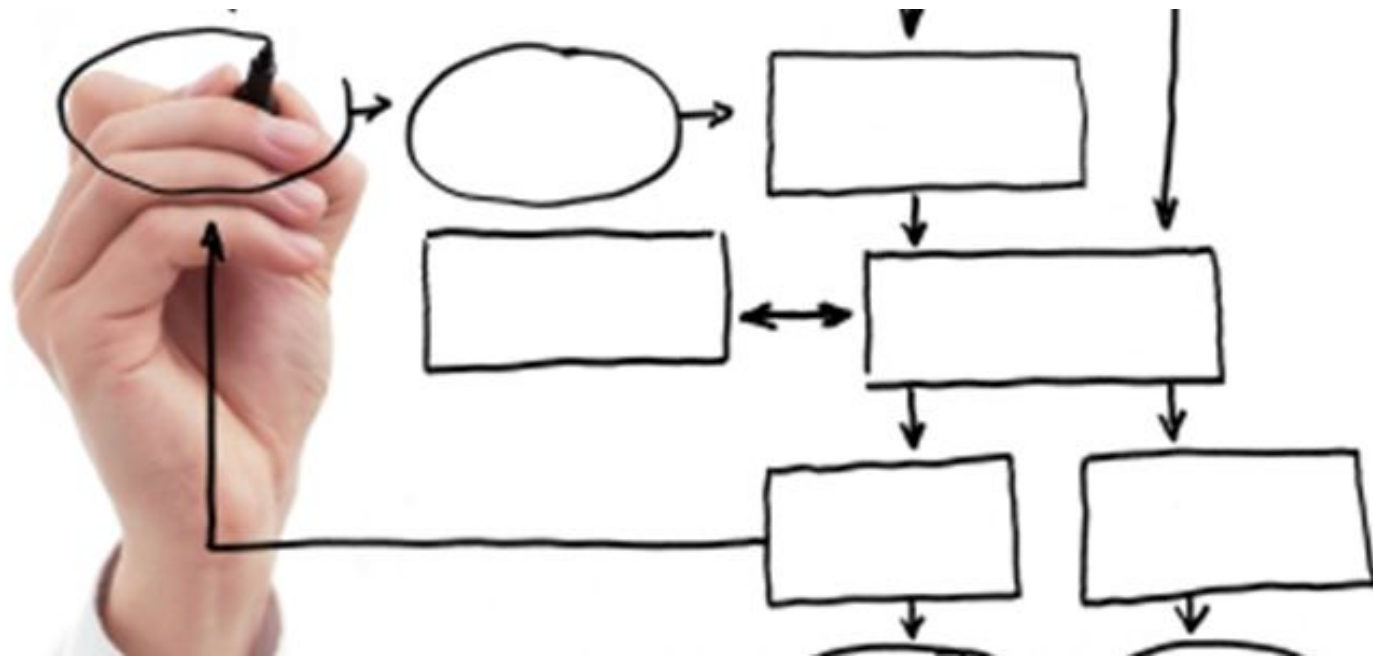
Caso Clínico:

PESQUISA DE HTLV1 E HTLV 2 QUALITATIVO, SANGUE	Liberado em: 10/01/2019 12:22:36
Coletado em: 07/01/2019 07:44	Método
Resultado	Nested PCR , RFLP
Positivo para HTLV - 1	
Exame liberado por Maíra Pedreshi Marques Baldassin - CRBM 12476	VERA APARECIDA DOS SANTOS
Nested PCR , RFLP (Journal of Virological Methods , 409 (1192) 163 - 174)	CRM 46204
Objetivo: Detecção de material proviral do HTLV - 1 e/ ou HTLV - 2, Integrado nas células mononucleares de sangue periférico	

Aplicações

- Bacterias
- Fungos
- Virus
- Parasitas





Metodologías Utilizadas para Diagnóstico

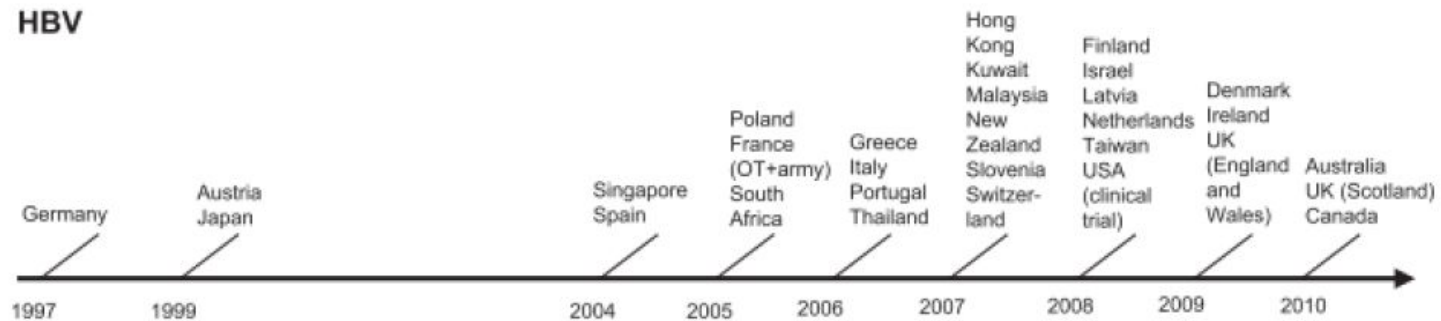
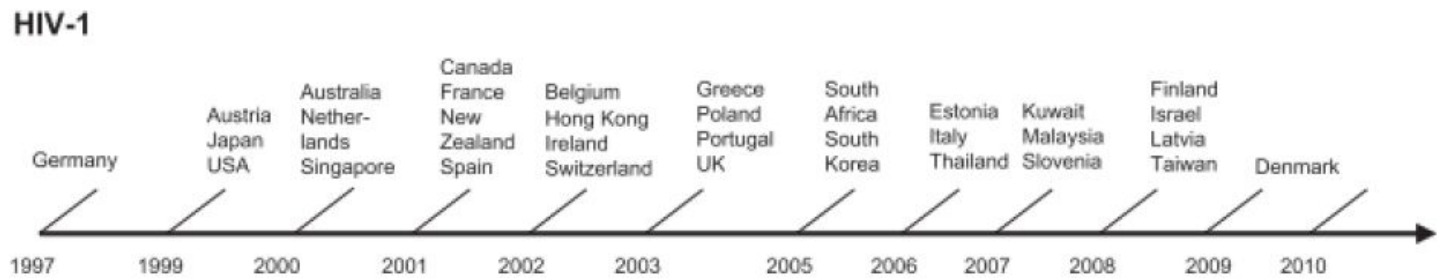
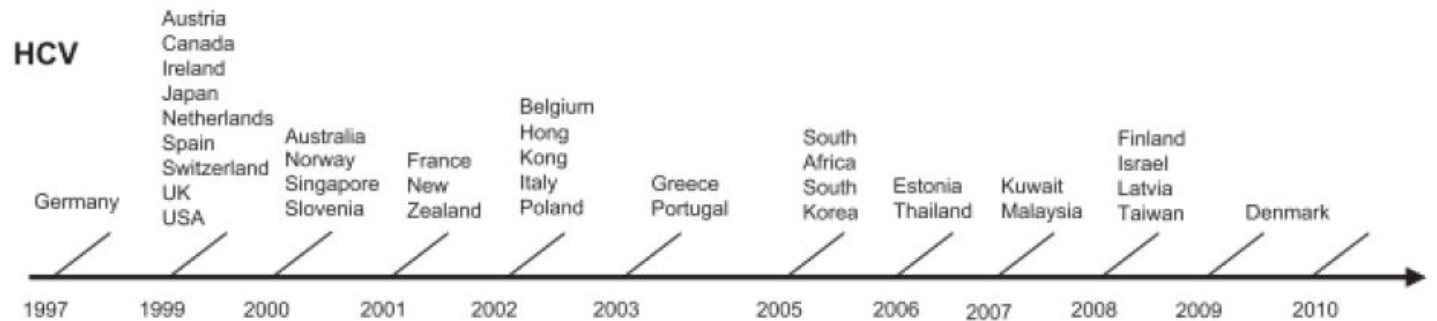
NAT

NAT – Nucleic Acid Technologies

- Teste qualitativo *in vitro*
- Detecção direta de material genético agente infeccioso
- Portaria nº158, 04 de fevereiro de 2016
- HBV, HCV e HIV

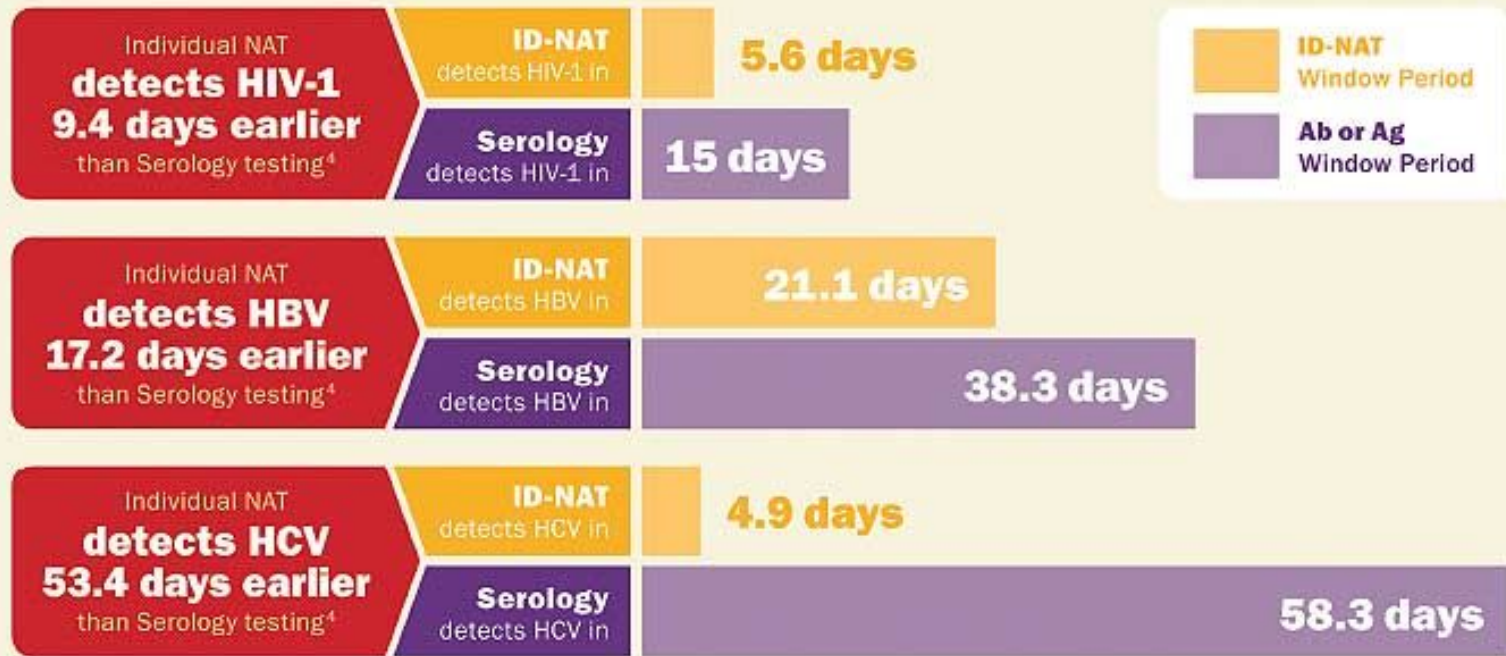


Implementação



Janela Imunológica pelo NAT

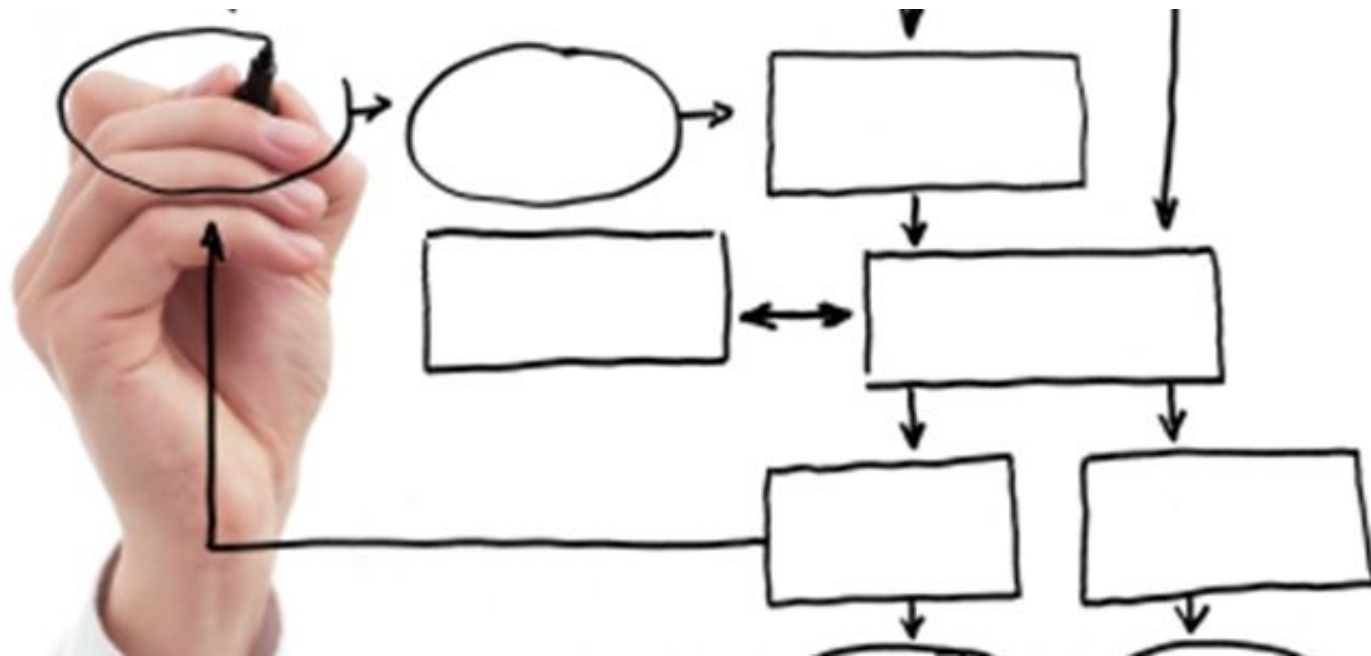
Window Period: Individual Nucleic Acid Testing (ID-NAT) vs. Serology



Janela Imunológica

Window Period: Individual Nucleic Acid Testing (ID-NAT) vs. Serology





Metodologias Utilizadas para Diagnóstico

PCR EM TEMPO REAL

PCR em tempo real

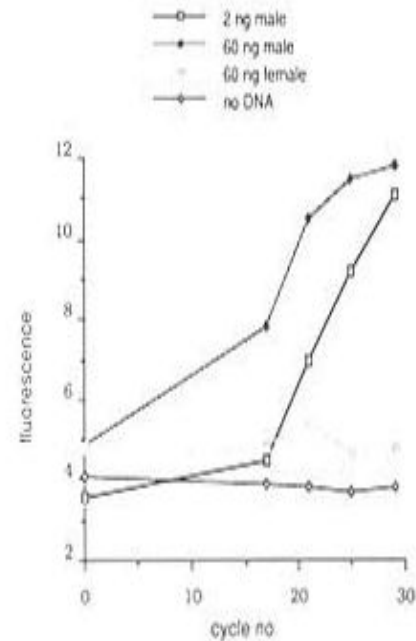
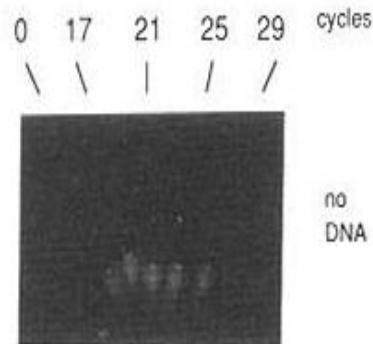
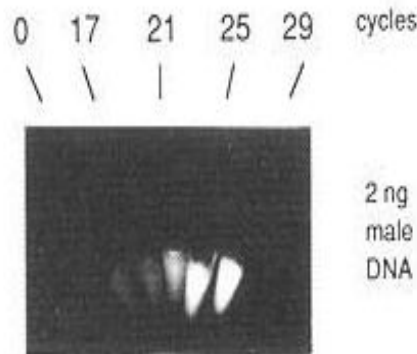
- Utiliza o mesmo princípio da PCR convencional
- Sonda marcada com fluoróforos que se hibridiza com a sequência-alvo
- Fluoróforos se intercalam entre as fitas de DNA
- Gera um sinal fluorescente que é acumulado
- Método quantitativo



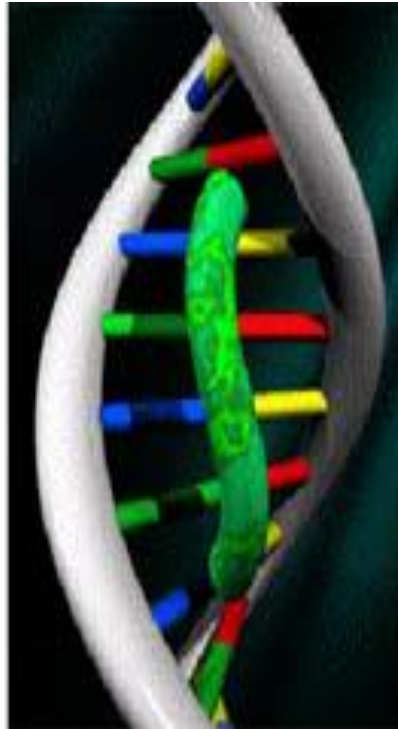
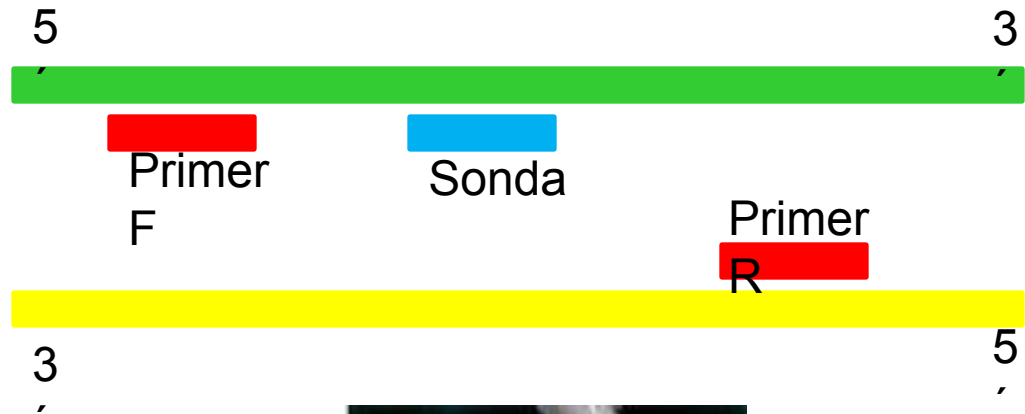
SIMULTANEOUS AMPLIFICATION AND DETECTION OF SPECIFIC DNA SEQUENCES

Russel Higuchi*, Gavin Dollinger¹, P. Sean Walsh and Robert Griffith

Roche Molecular Systems, Inc., 1400 53rd St., Emeryville, CA 94608. ¹Chiron Corporation, 1400 53rd St., Emeryville, CA 94608. *Corresponding author.



PCR em tempo real

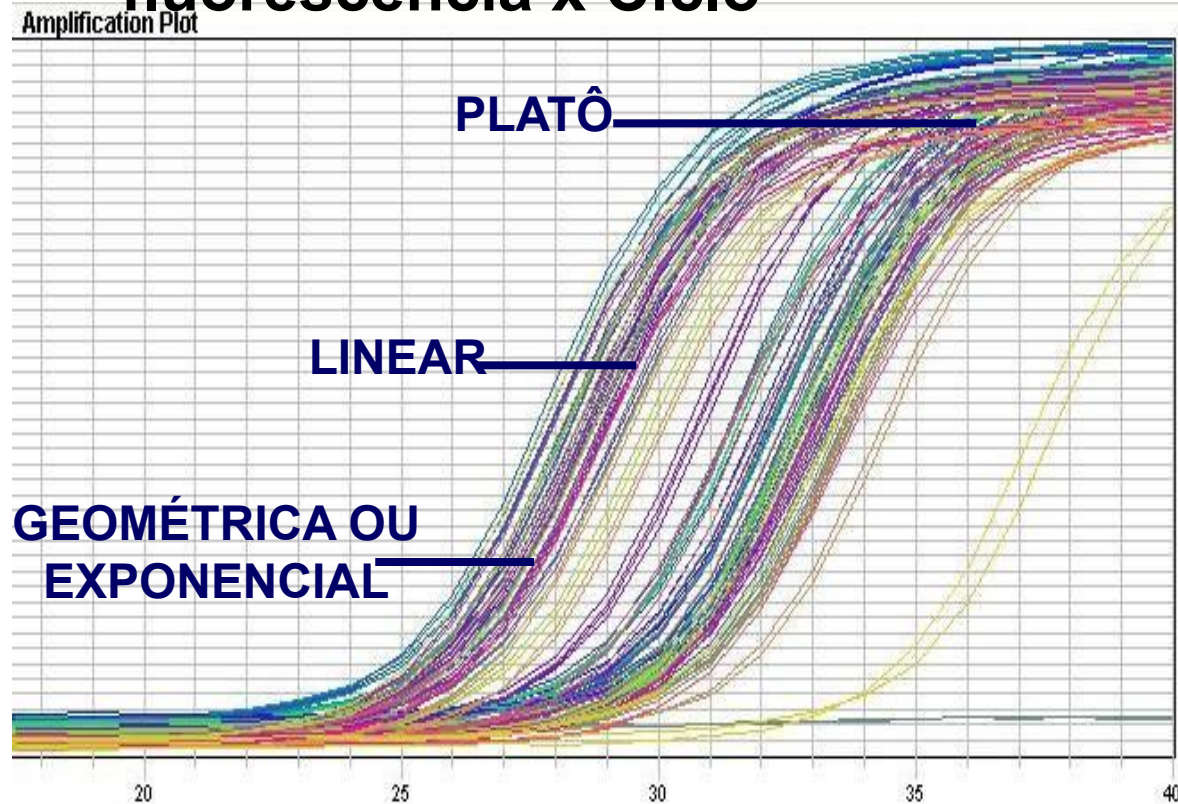


PCR em tempo real: equipamentos

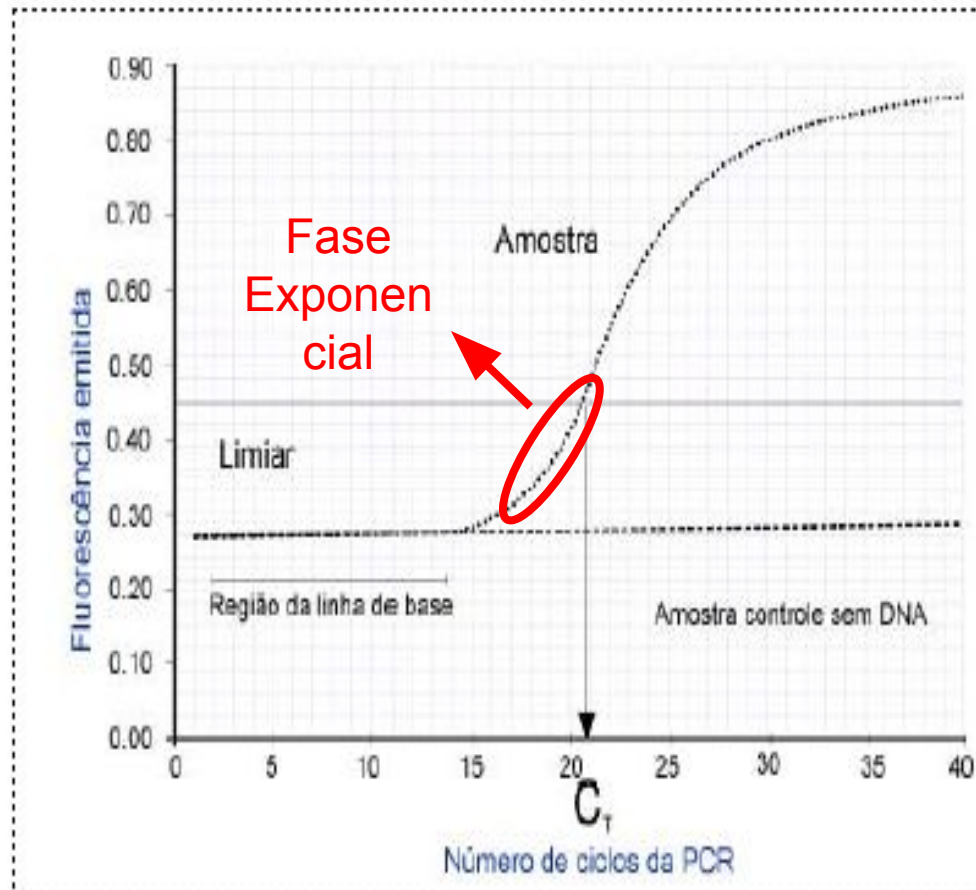


PCR em tempo real: Gráfico de amplificação

Intensidade de fluorescência x Ciclo

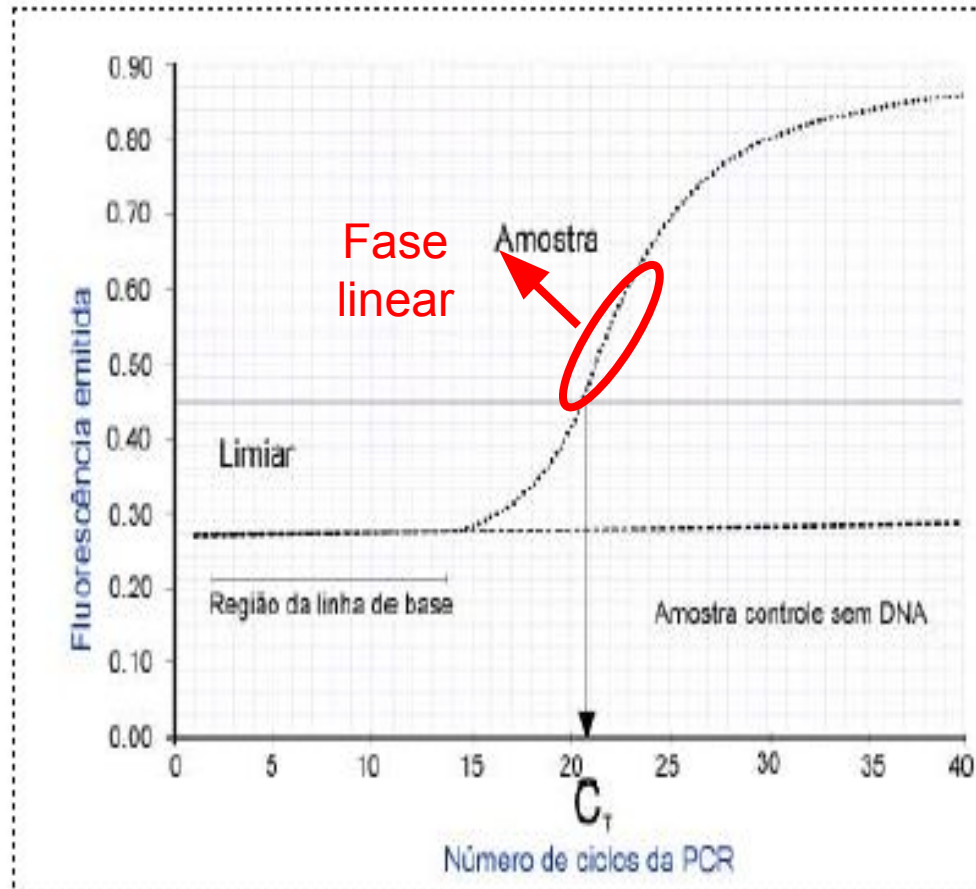


PCR em tempo real: fase exponencial



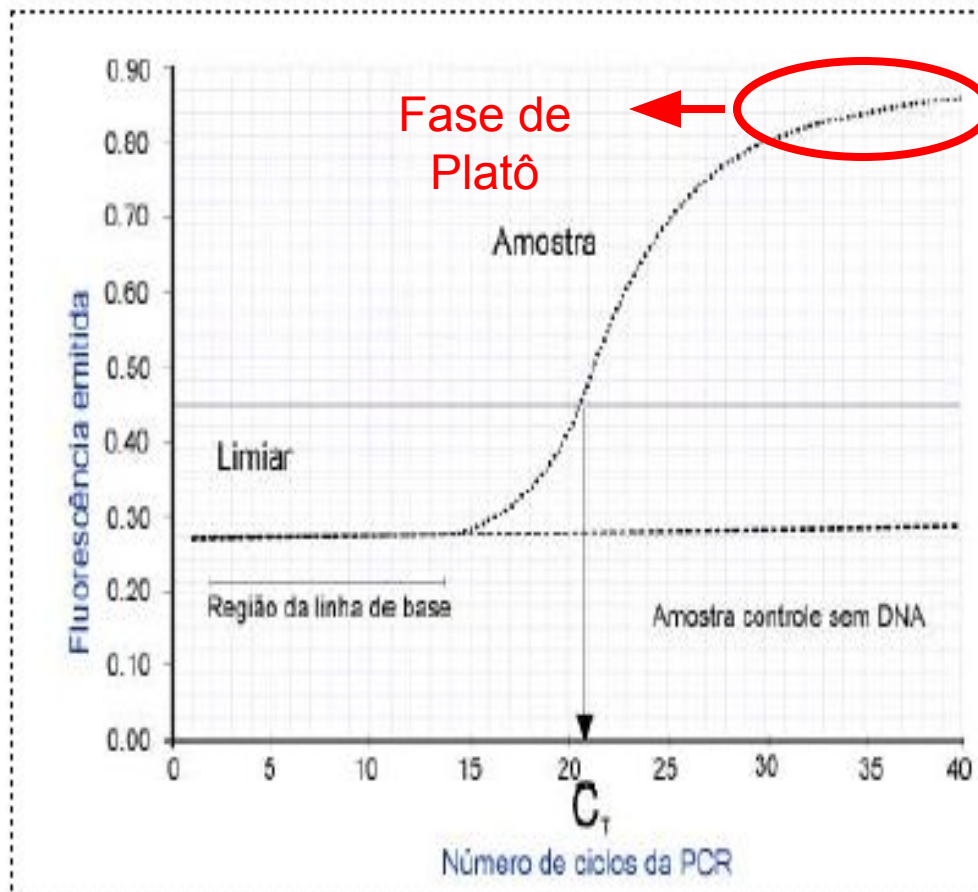
Fase Geométrica ou Exponencial: alta precisão na duplicação do número de moléculas da reação

PCR em tempo real: fase exponencial



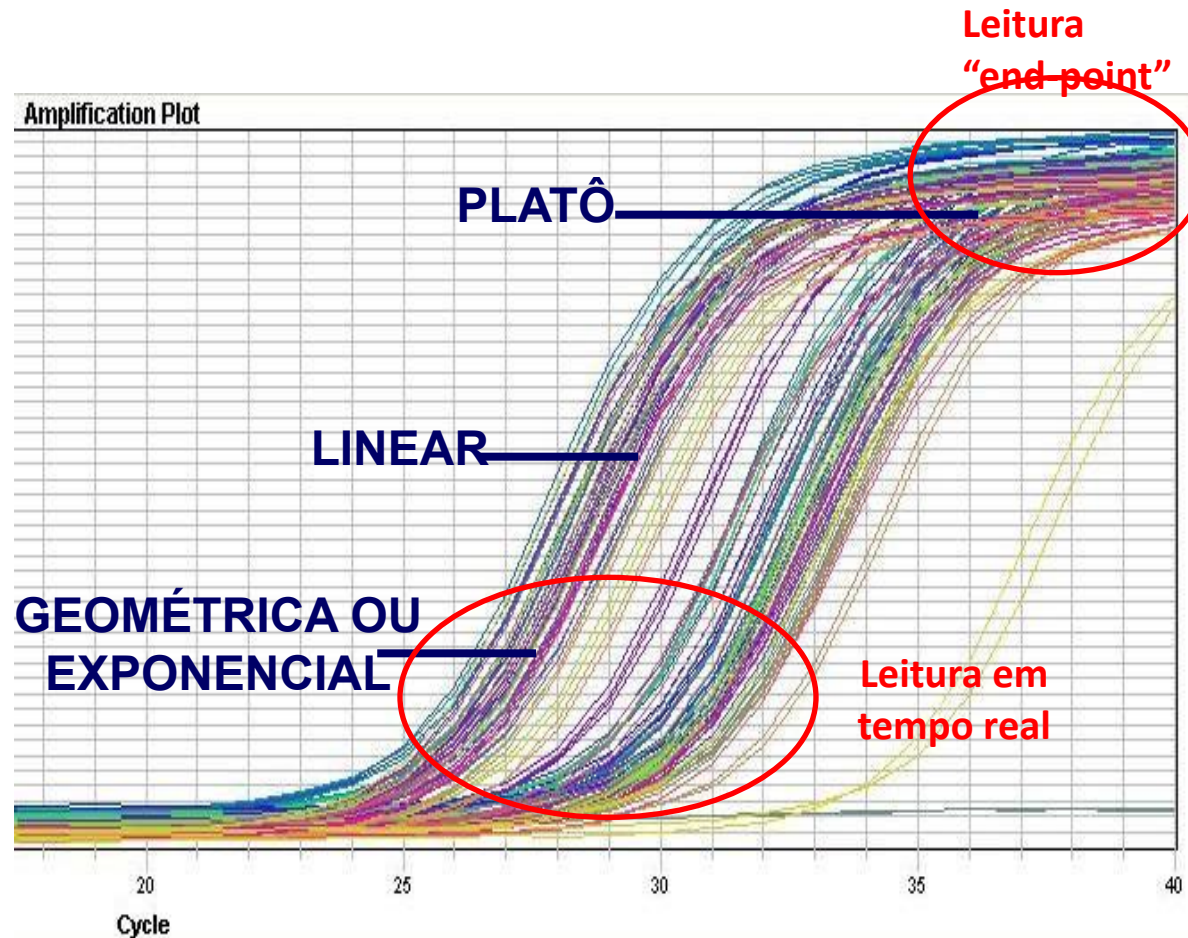
Fase Linear (Alta variabilidade) : escassez de um ou mais reagentes, geralmente primers

PCR em tempo real: fase exponencial



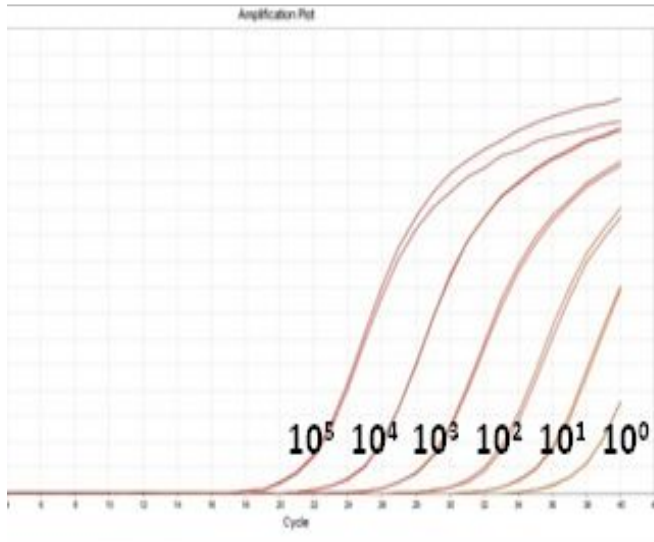
Fase Platô (detecção PCR convencional): a eficiência de amplificação cai drasticamente para níveis insignificantes, com baixa ou nenhuma produção de novas cadeias de DNA

PCR em tempo real: fase exponencial



Fase Geométrica ou Exponencial: alta precisão na duplicação do número de moléculas da reação. Reagentes em excesso.

PCR em tempo real: Quantitativa



Caso Clínico:

CARGA PROVIRAL HTLV-I

Resultado (Nº de cópias em 10 mil células mononucleares): 85 cópias.

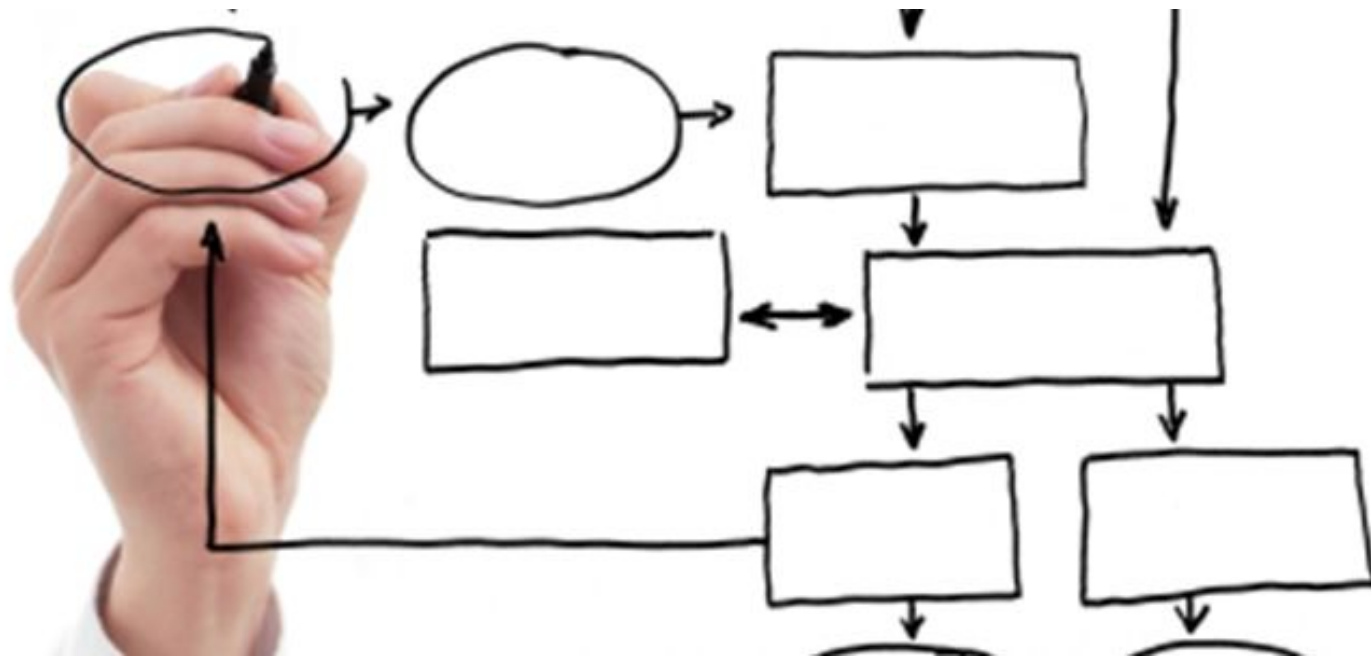
Técnica: Reação em cadeia da Polimerase em tempo real.

Método: Taqman/Sonda FAM/TAMRA para a região *pol* do HTLV-I (Dehee et al. J. Virol. Methods, 102: 34-51, 2002).

Limite de detecção: 10 cópias/10 mil células mononucleares.

Considerações: A quantificação de carga proviral do HTLV-I esta validada somente para uso em pesquisa clínico-laboratorial. Sua utilização e, sobretudo interpretação na prática clínica deve considerar os dados clínicos, genéticos, virológicos e imunológicos envolvidos na questão da patogênese e resposta ao tratamento da infecção pelo HTLV-I.

Obs:

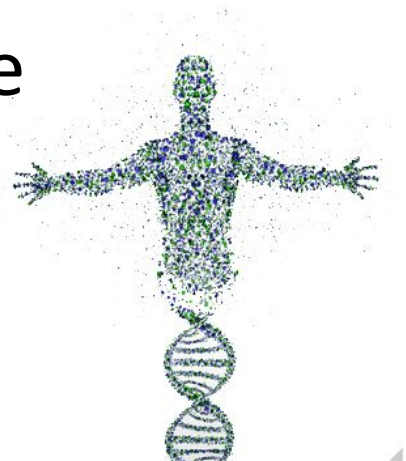


Metodologias Utilizadas para Diagnóstico

SEQUENCIAMENTO

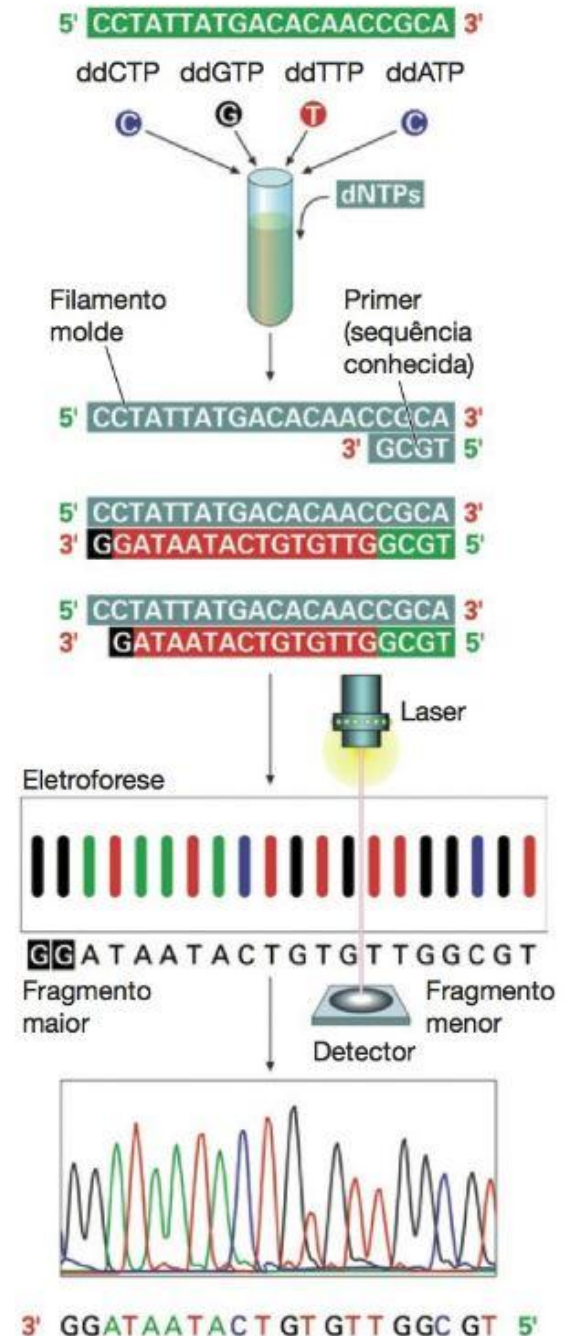
Metodologia

- Processo realizado para se determinar a sequência exata de nucleotídeos em uma molécula de DNA
- A sequência nucleotídica é a base para o conhecimento de um gene ou genoma.
- Através dela é possível compreender a construção e estrutura das células e organismos.



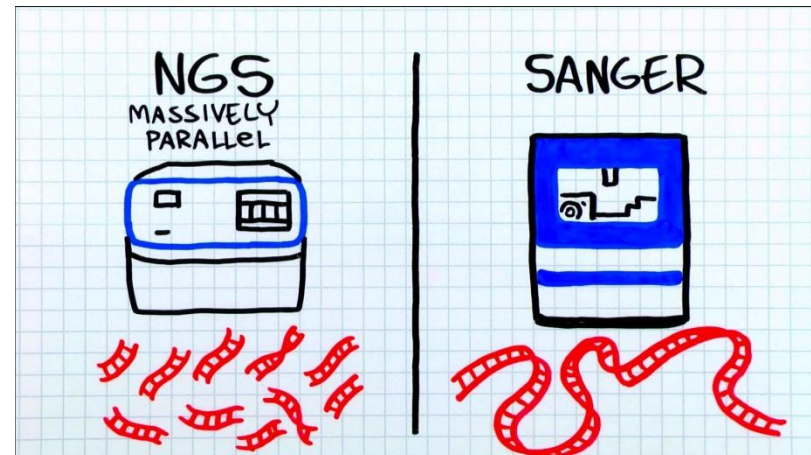
Sanger

- O molde de DNA a ser sequenciado;
- A sequência do iniciador (primer);
- DNA-polimerase;
- Os quatro bases (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- Bases marcado radiotivamente ou por um corante fluorescente
- A enzima DNA-polimerase adiciona bases livres ao DNA unifilamentar, usando o pareamento de bases complementares.

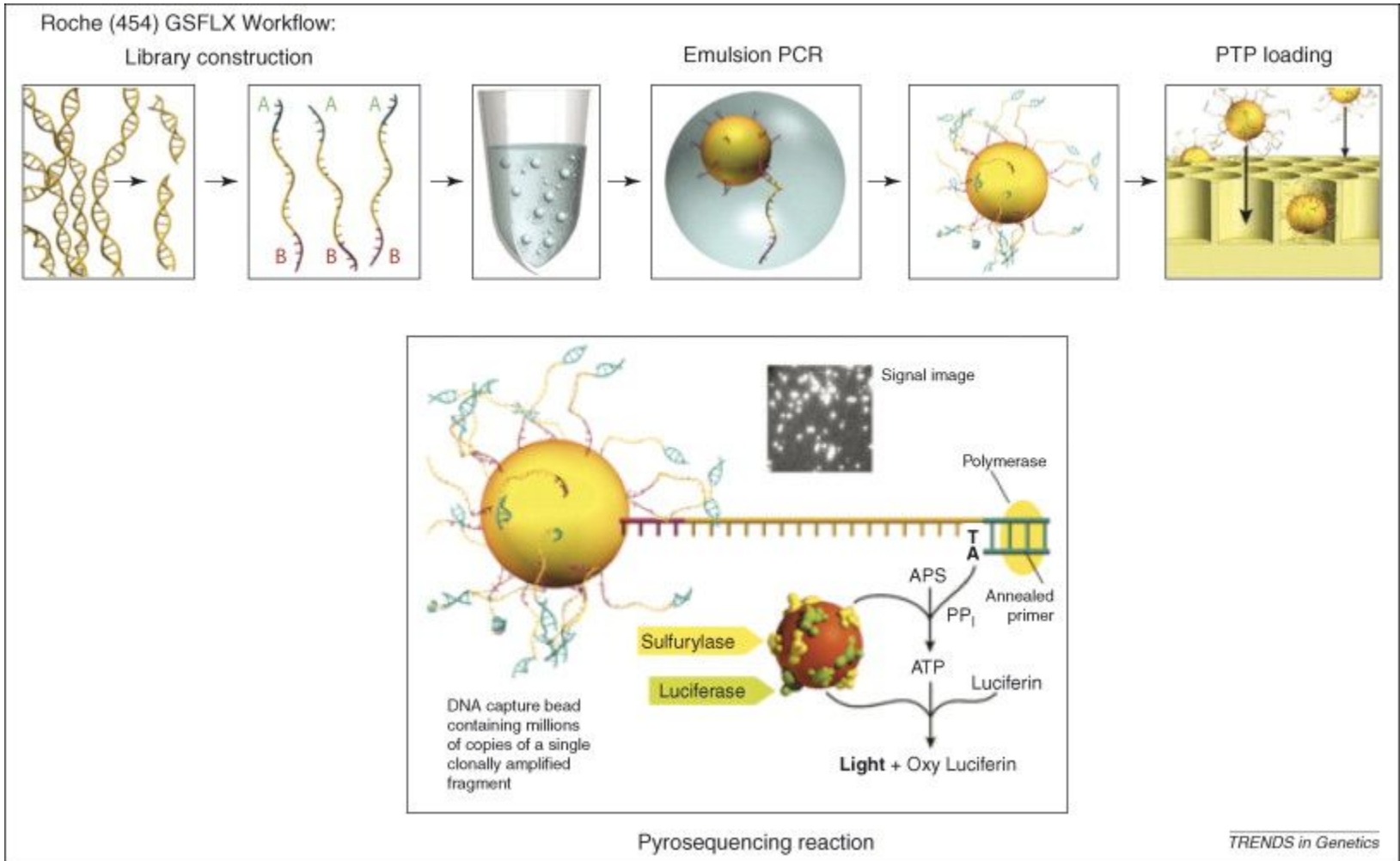


Next-Generation Sequencing (NGS)

- Realiza o sequenciamento de um genoma inteiro em questão de dias;
- Vantagens: velocidade, capacidade de gerar dados em larga escala , precisão e custo inferior ;
- Sequencia várias moléculas diferentes (ou vários fragmentos diferentes provenientes do mesmo genoma) em paralelo;
- Diferem fundamentalmente das metodologias de Sanger, em que uma única sequência de DNA;
- Metodologia integrada : ferramentas de nanotecnologia, robótica e informática em aparelhos de alto desempenho.

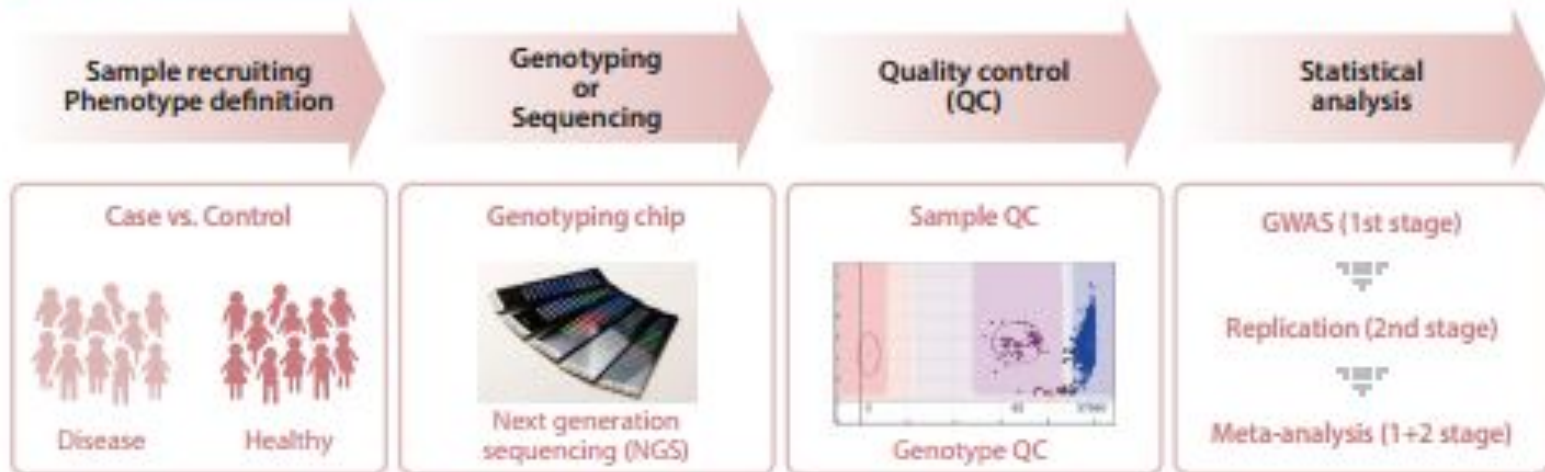


Exemplo NGS

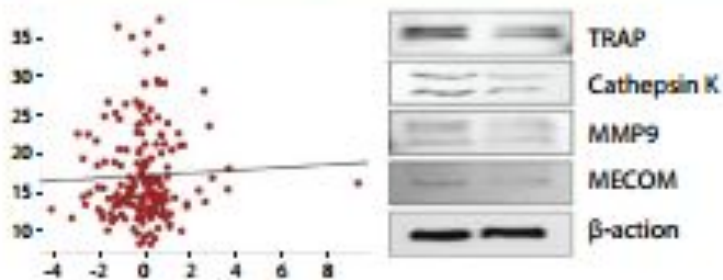


GWAS

A Overall workflow of GWAS



B Prediction model & Functional evaluation



C Application



Obrigada...



Tatiane Assone
tatianeassone@usp.br

