

**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 pela presença de anticorpos contra esse vírus no soro do paciente (sorologia).

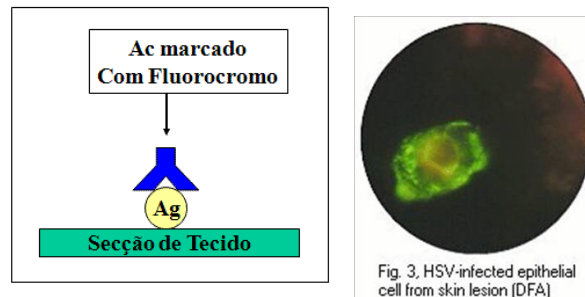
**Exames diretos**

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

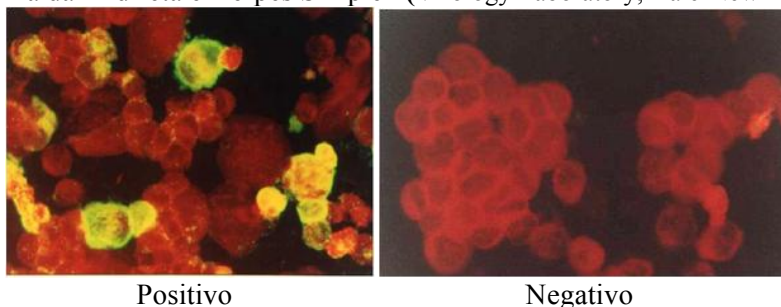
1. Microscopia óptica: morfologia das células (efeito citopático) e corpos de inclusão (comentados na aula 1).
2. Microscopia eletrônica: morfologia das partículas virais, imuno-microscopia eletrônica.
3. Detecção do antígeno: imunofluorescência direta, hemaglutinação, e aglutinação passiva.
4. Detecção do genoma viral: técnicas de hibridização, PCR.

Comentaremos apenas duas das técnicas para detecção de antígenos, a imunofluorescência direta e a hemaglutinação.

A **imunofluorescência direta** é feita com anticorpos específicos contra antígenos de um determinado vírus, conjugados a fluoróforos como o isotiocianato de fluorceína, que fluoresce em verde ao ser exposto à luz ultra-violeta no microscópio de fluorescência, emitindo fluorescência típica (Figs 1 e 2).



**Fig 1.** Esquema da IF direta e Herpes Simplex (Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)



**Fig 2.** Vírus respiratório sincicial humano. Células de aspirado naso-faríngeo. (Laboratório de Virologia Molecular, ICB-USP)

Amostras utilizadas (vírus mais frequentemente detectados):

- Aspirado naso-faríngeo (Vírus sincicial respiratório, Influenza A e B, Parainfluenza, Adenovírus)
- Fezes (Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus).
- Pele (Herpes Simplex, Varicela Zóster)
- Sangue (Citomegalovírus)

Alguns vírus, ou antígenos derivados de vírus, ligam a hemácias através de receptores existentes na superfície destas. Como resultado, as hemácias aglutinam, sendo este fenômeno chamado de **hemaglutinação**. A reação de hemaglutinação é uma técnica simples. Basicamente, as hemácias em suspensão são colocadas em contato com uma suspensão de vírus, ou do antígeno hemaglutinante. Por ação da gravidade, as hemácias aglutinadas sedimentam de forma difusa. Na ausência de vírus, as hemácias sedimentam na forma de um botão compacto, no fundo do tubo ou da placa (Fig 3). O vírus da influenza, por exemplo, aglutina hemácias de galinha, cobaio, carneiro e humanas do grupo O. Diluições crescentes do estoque viral podem ser testadas para determinar o título desse estoque em unidades hemaglutinantes.

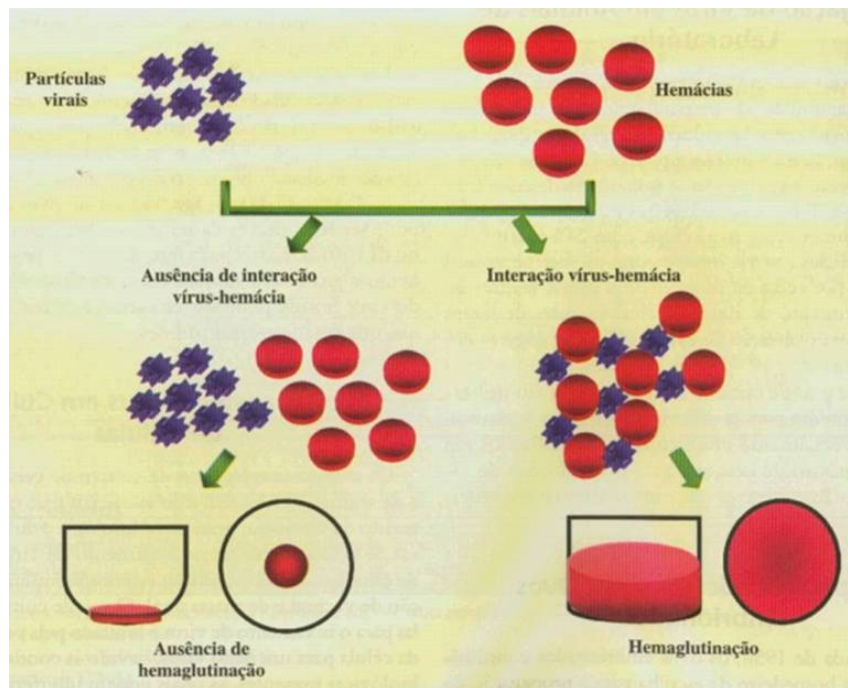


Fig 3

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

### 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.

Critérios para diagnosticar infecção primária:

- Aumento de 4 vezes ou mais no título de IgG ou anticorpos totais, dosados no soro obtido nas fases aguda e convalescente (soro conversão).
- Presença de IgM.
- Um título alto de IgG ou anticorpos totais (pouco confiável).

Critérios para diagnosticar reinfecção:

- Aumento de 4 vezes ou mais no título de IgG ou anticorpos totais, dosados no soro obtido nas fases aguda e convalescente.
- Ausência ou pequeno aumento de IgM.

O perfil sorológico típico após infecção aguda está apresentado à Fig 4. Após a reinfecção, IgM pode estar ausente ou presente em baixos níveis de forma transiente.

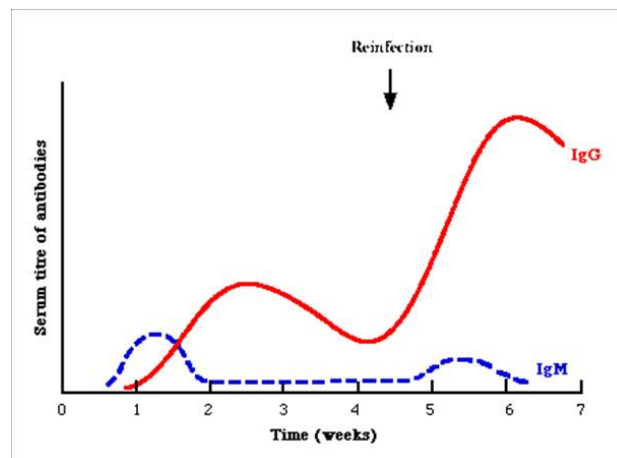


Fig 4

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 5. 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 (ex: células infectadas).

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 6 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. Os anticorpos secundários são reagentes muito versáteis, úteis para detectar anticorpos humanos contra diferentes antígenos em diferentes protocolos experimentais.

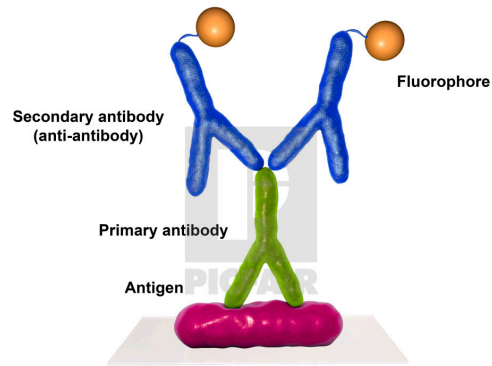
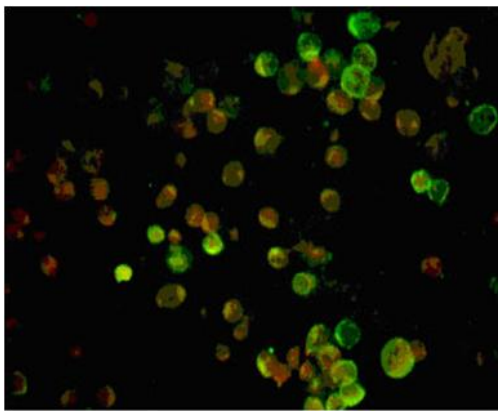
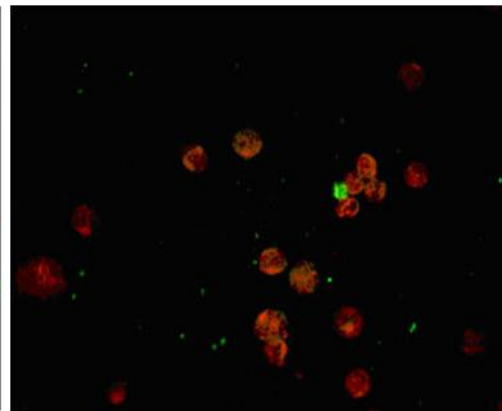


Fig 5



Positivo



Negativo

Fig 6

### 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 7). 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, usando vírus padrões mantidos no laboratório.

Para determinar o título do soro (concentração em que inibe a hemaglutinação), a metodologia da diluição seriada é fundamental, e está esquematizada à Fig 8. Nessa figura temos também uma foto de diluição seriada sendo feita em placa de 96 poços com um pipetador automático multicanal, facilitando o trabalho quando há muitas amostras.

Para diagnóstico sorológico, deve-se colher duas amostras de soro do paciente: uma na fase aguda, logo que se manifesta a doença e outra, na fase convalescente, duas semanas após. 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 da infecção por este vírus. Este aumento de título, de pelo menos 4 vezes é chamado de **soro conversão**, conforme comentado anteriormente. À Fig 9 temos representado esquematicamente um resultado de inibição da hemaglutinação, identificando o influenza responsável por uma epidemia. À Fig 10 está apresentada uma foto de placa com um resultado “real” de inibição de hemaglutinação, mostrando uma soro conversão.

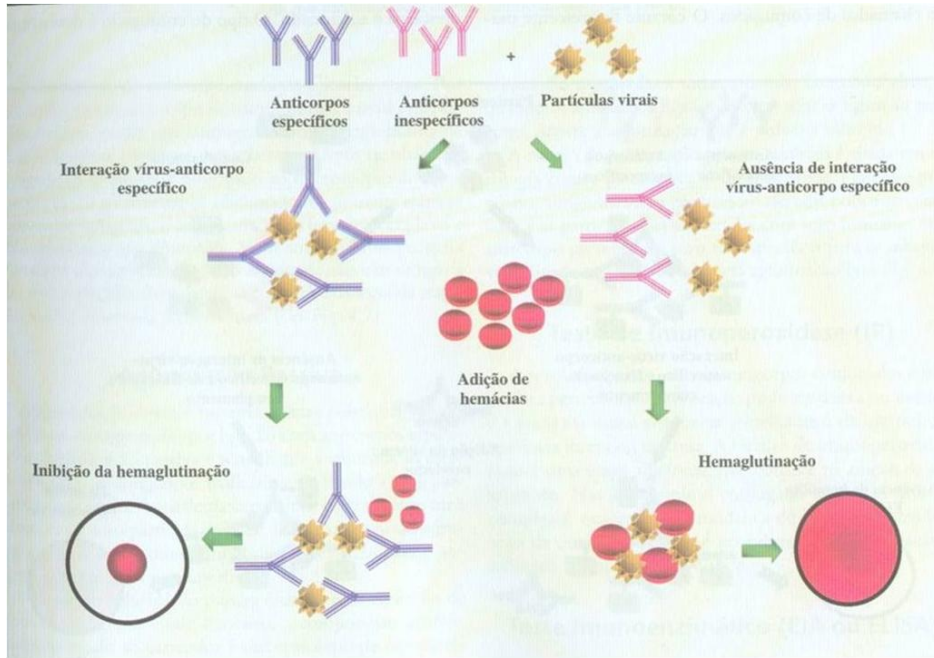


Fig 7

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

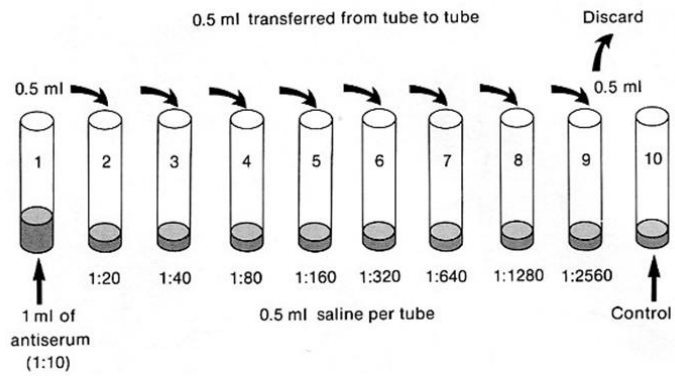
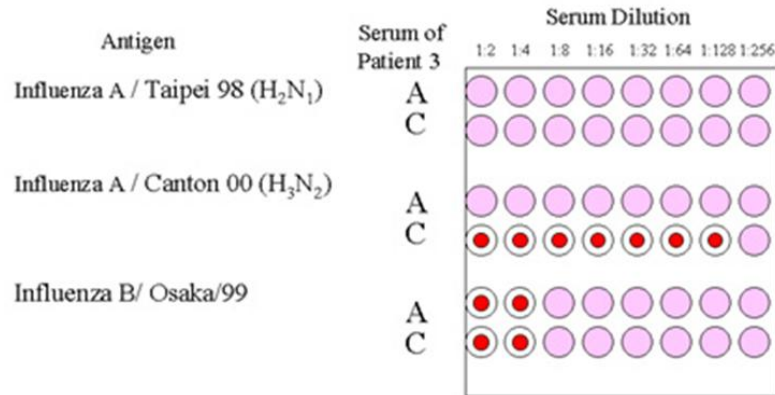


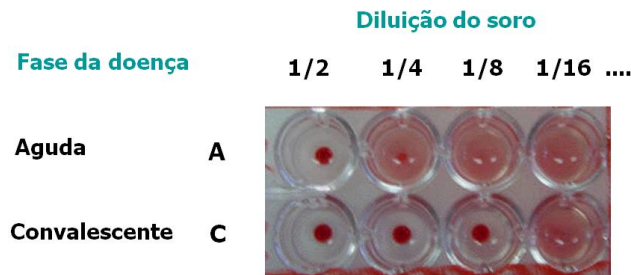
Fig 8

Diluição seriada.



**Fig 9**

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



**Fig 10**

Foto de um resultado para inibição da hemaglutinação

### ELISA e Western Blot / Diagnóstico de HIV

As duas últimas metodologias de sorologia que comentaremos, ELISA e Western Blot, 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 através da reação 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 (e não sua mistura).

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

### Exercício prático 1: Determinação de anticorpos anti-HIV através do ensaio imunoenzimático.

**Atenção:** Este ensaio no ponto em que é disponibilizado em aula não possui nenhum vírus viável, portanto, não constitui risco.

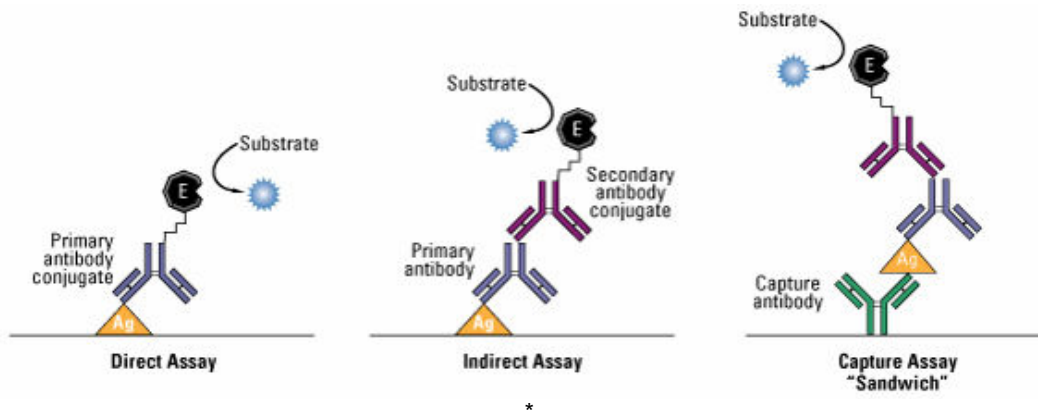
1. Uma microplaca foi sensibilizada com uma mistura de antígenos de HIV: proteínas p24 e gp160 (precursora da gp120 e da pg41) obtidas a partir de vírus cultivados em células H9 e purificadas. Esta mistura de antígenos foi distribuída nas fileiras A, C, E e G da placa.
2. Como controle de especificidade foi feita sensibilização com antígenos celulares, obtidos de células H9 não infectadas, nas fileiras B, D, F e H.
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.

#### Etapas a serem executadas durante a prática:

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:

Como discutido na aula sobre Diagnóstico Viral (ver apostila), existem várias estratégias de detecção dos anticorpos no soro de um paciente, baseadas na reação desse anticorpo com um antígeno numa amostra, preparada de tal forma que esse antígeno esteja imobilizado. Esse é o caso das metodologias de ELISA e Western Blot. Na figura abaixo temos os esquemas das várias estratégias, sendo que 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).



Detalhando para o ensaio de ELISA:



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.

Anotar os resultados no esquema da placa abaixo

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

C+ Controle Positivo; C- Controle Negativo; 31 a 36 Amostras

### Exercício prático 2: Determinação de anticorpos anti-HIV através da reação de Western-blot (Demonstração).

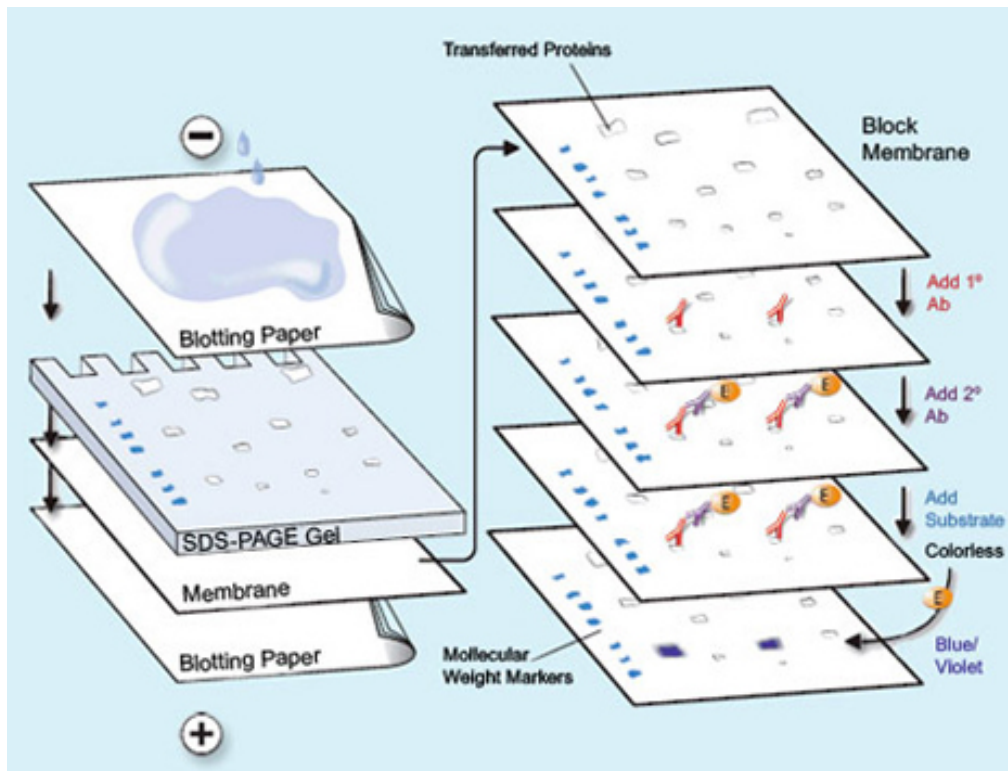
A técnica de Western blot tem sido utilizada na caracterização do perfil antigênico do HIV e na descrição da resposta imune para este vírus em pessoas expostas ou infectadas. Devido a seu alto custo mas grande sensibilidade, é comumente utilizada apenas como teste confirmatório, sendo o ensaio imunoenzimático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

O princípio da reação é o mesmo do ensaio imunoenzimático, mas na reação 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.

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.



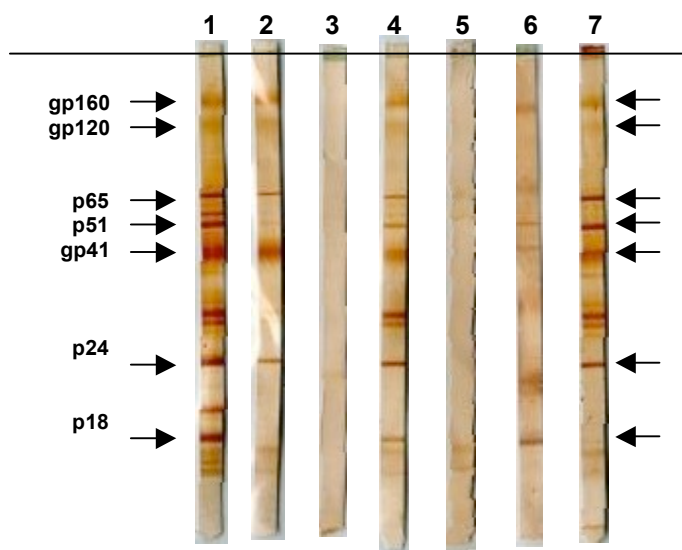
A figura abaixo mostra o esquema geral de um western blot. Para a produção das fitas é feito um gel preparativo com uma única canaleta.



**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

**QUESTÕES:**

1. No ensaio de ELISA, descreva os resultados obtidos para os controles positivos e negativos.
2. Qual o resultado obtido para as amostras testadas?
3. Considerando estes resultados, quais as amostras que deverão ser submetidas a testes confirmatórios (Western-blot)?
4. Comparando com os controles, quais foram os resultados das amostras analisadas?
5. Determine o diagnóstico final para cada amostra analisada e discuta o procedimento com relação aos pacientes envolvidos.