

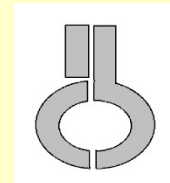
Diagnóstico laboratorial dos vírus.

Integrado de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP)

para Farmácia – 0420136

Prof. Armando Ventura

**As figuras desta apresentação que têm direitos
autorais, são aqui utilizadas para ensino
sem fins lucrativos.**



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

1. Microscopia óptica: morfologia das células corpos de inclusão. **Já comentado.**
2. Microscopia eletrônica: morfologia das partículas virais. **Já comentado.**
3. Detecção do antígeno: imunofluorescência direta, hemaglutinação, aglutinação passiva imunocromatografia, ELISA direto, biosensores
4. Detecção do genoma viral: técnicas de hibridização, técnicas baseadas em amplificação do genoma viral (“PCRs”).

Detecção de antígenos virais

Exames diretos, exemplos

Amostra clínica

Vírus detectado

Aspirado nasofaringe

**Coronavírus
Vírus sincicial respiratório
Influenza A e B
Parainfluenza
Adenovírus**

Fezes

**Rotavirus
Adenovírus
Astrovirus**

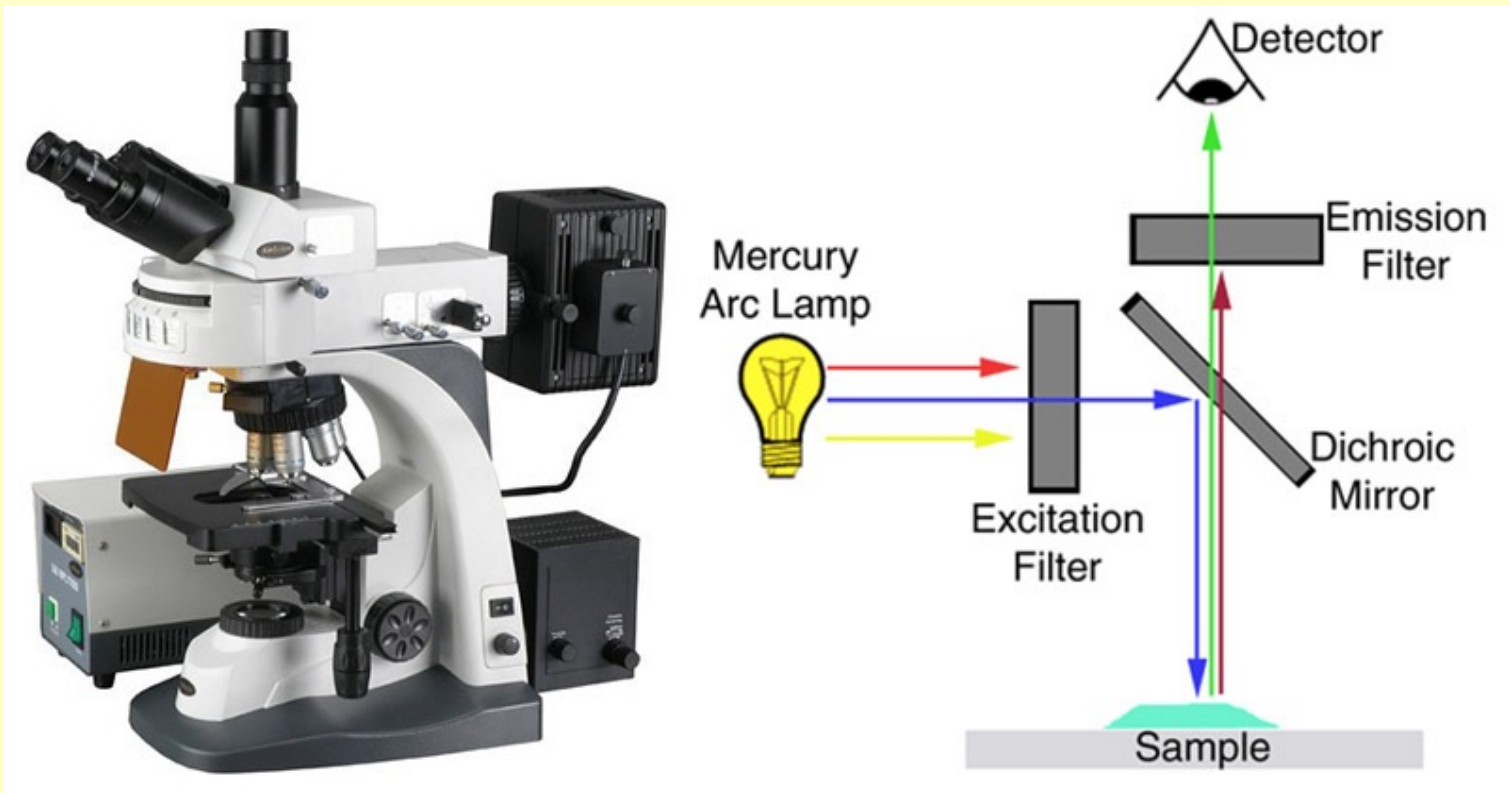
Pele

**Herpes Simplex
Varicela Zóster
Molusco contagioso**

Sangue

**Citomegalovírus
Hepatites B / C
HIV**

Imunofluorescência



Imunofluorescência direta

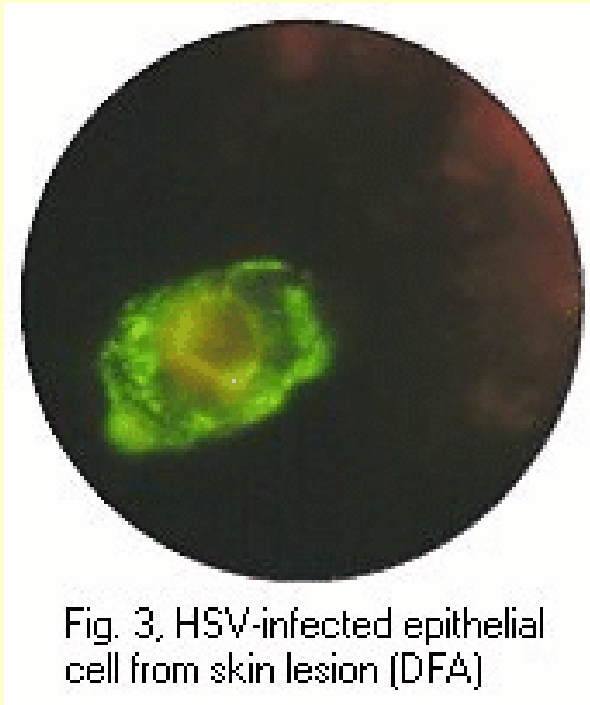
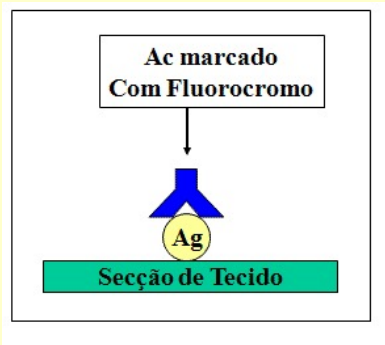
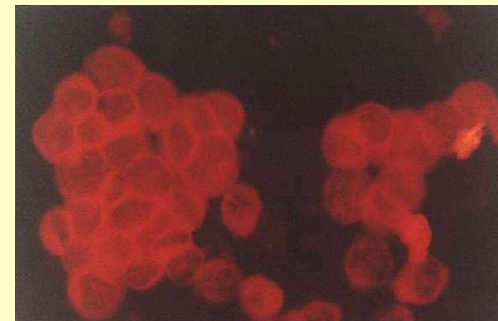
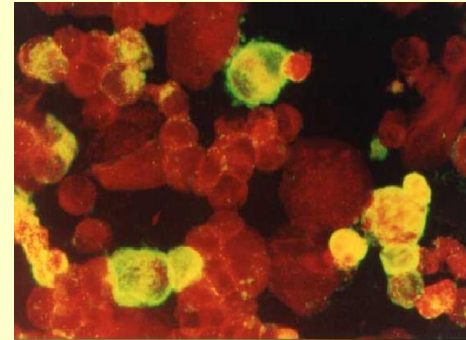


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

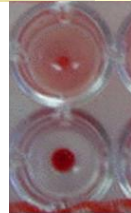
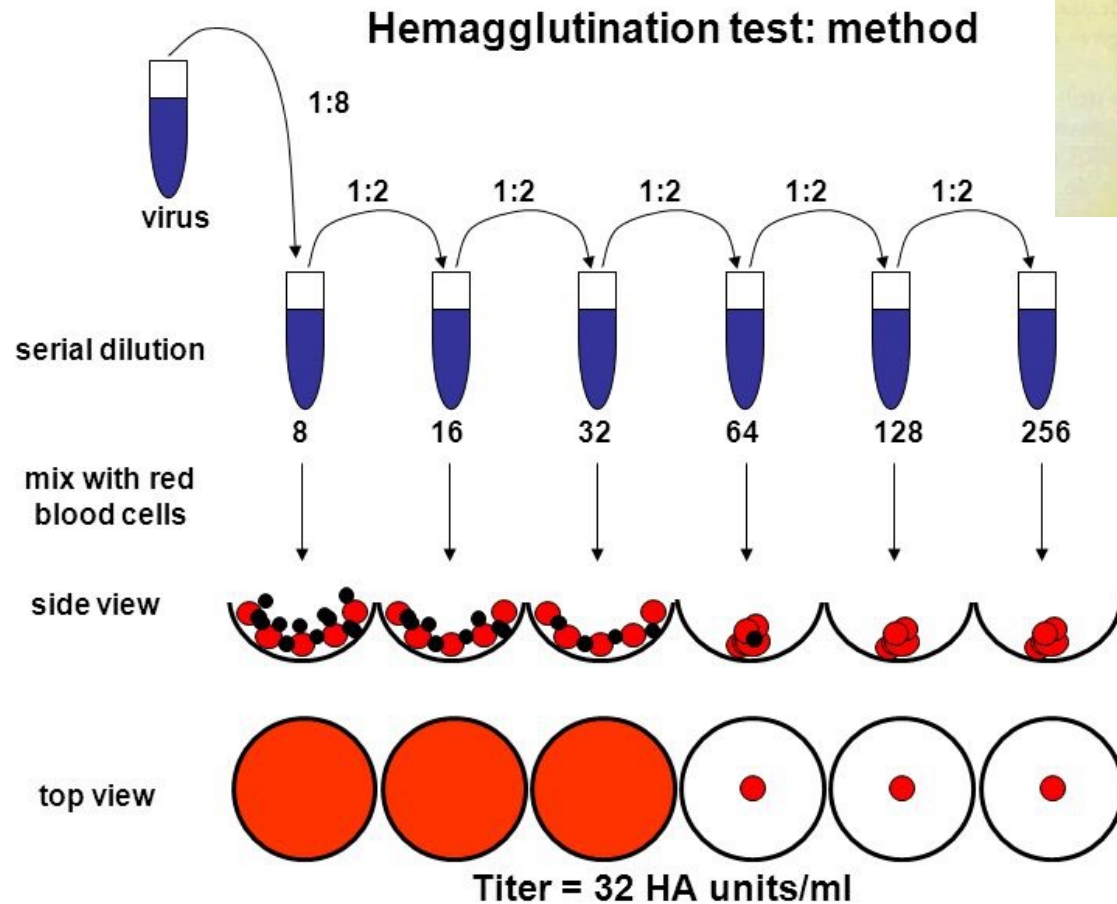
(Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)



Vírus respiratório sincicial humano. Amostra positiva no topo, e negativa abaixo.

(Laboratório de Virologia Molecular, ICB-USP)

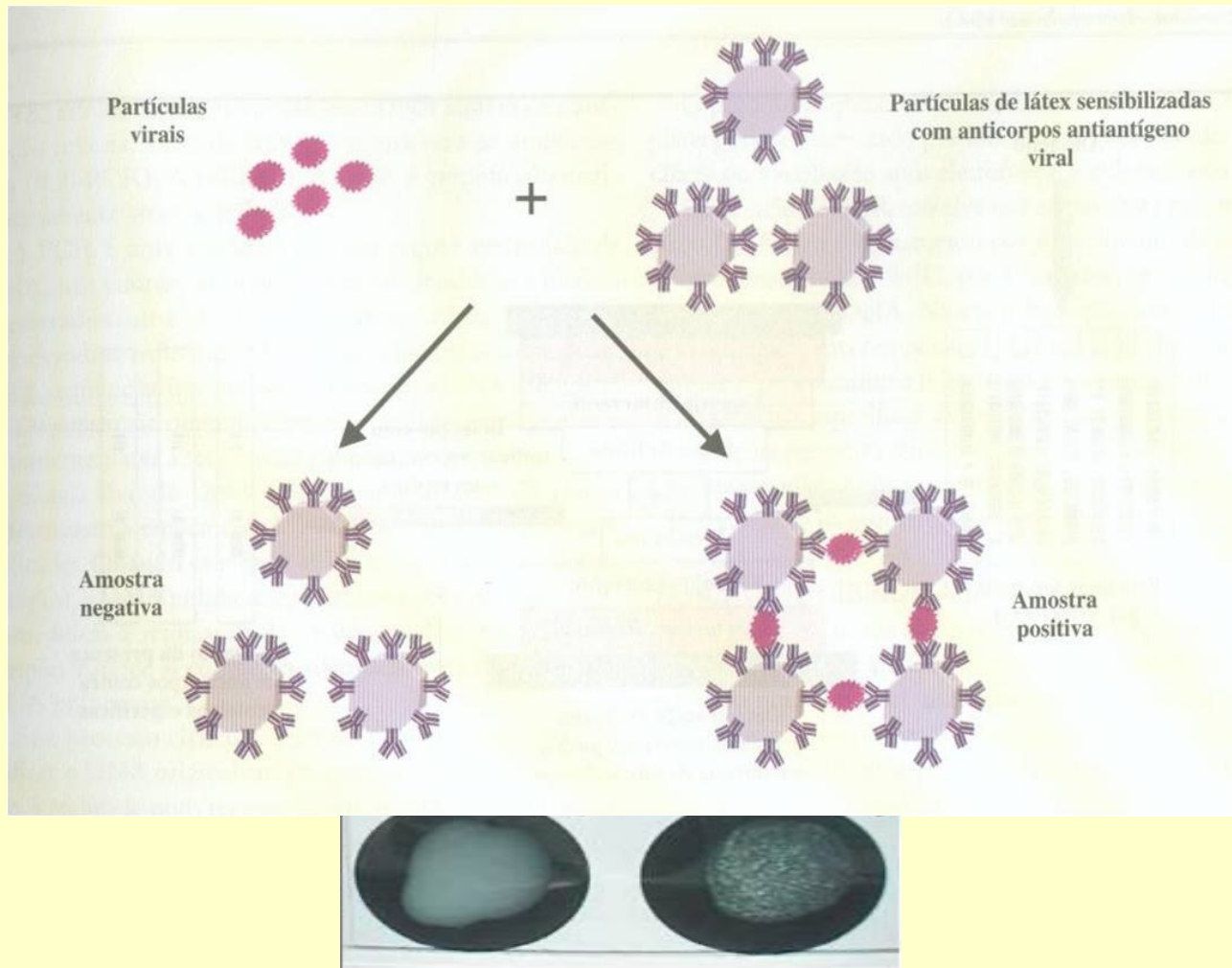
Hemaglutinação



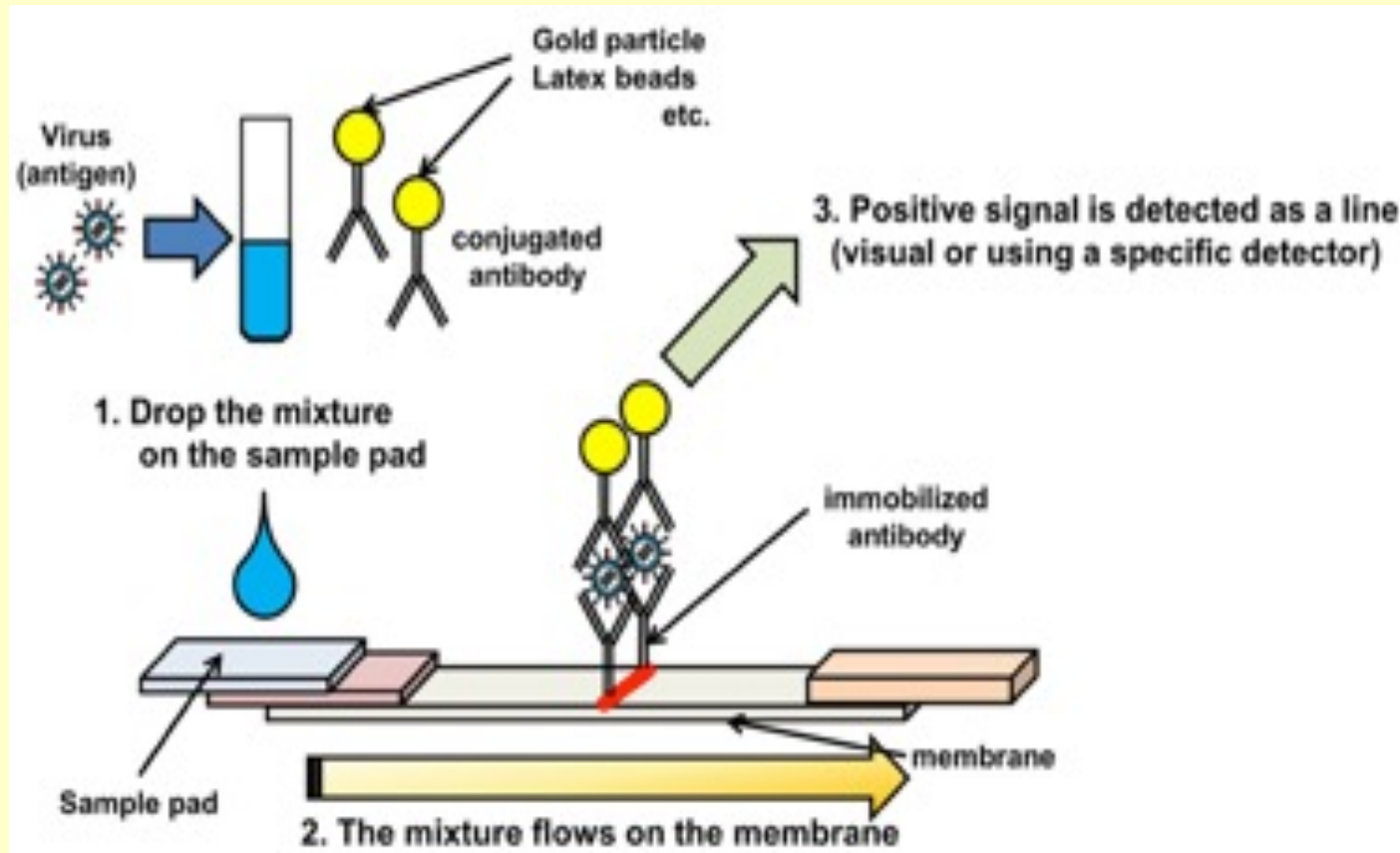
Hemácias de galinha 1%

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

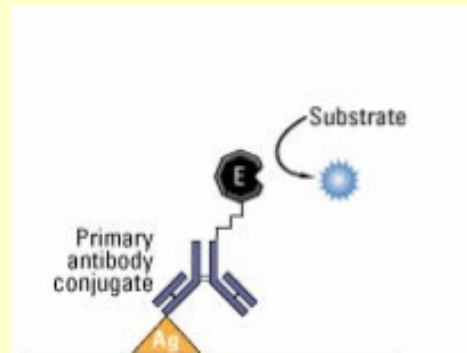
Aglutinação passiva



Imunocromatografia

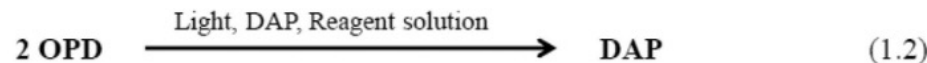
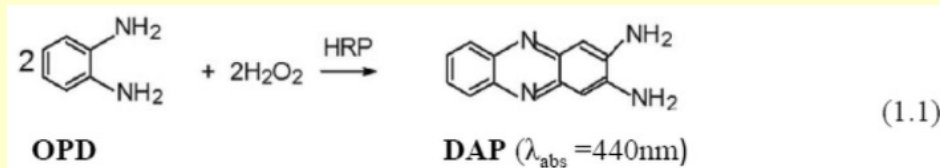


ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) direto



Amostra com vírus (?) fixada a suporte sólido →

- + anticorpo específico contra antígeno viral conjugado à enzima peroxidase (HRP)
- + ortofenilenodiamina (OPD)
- + substrato H_2O_2 , gera H_2O e $O\bullet$, que ataca OPD incolor, gerando DAP (amarelo)

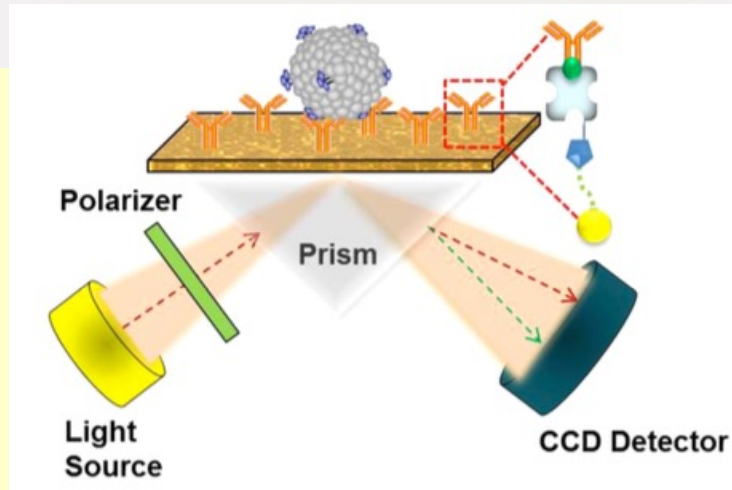
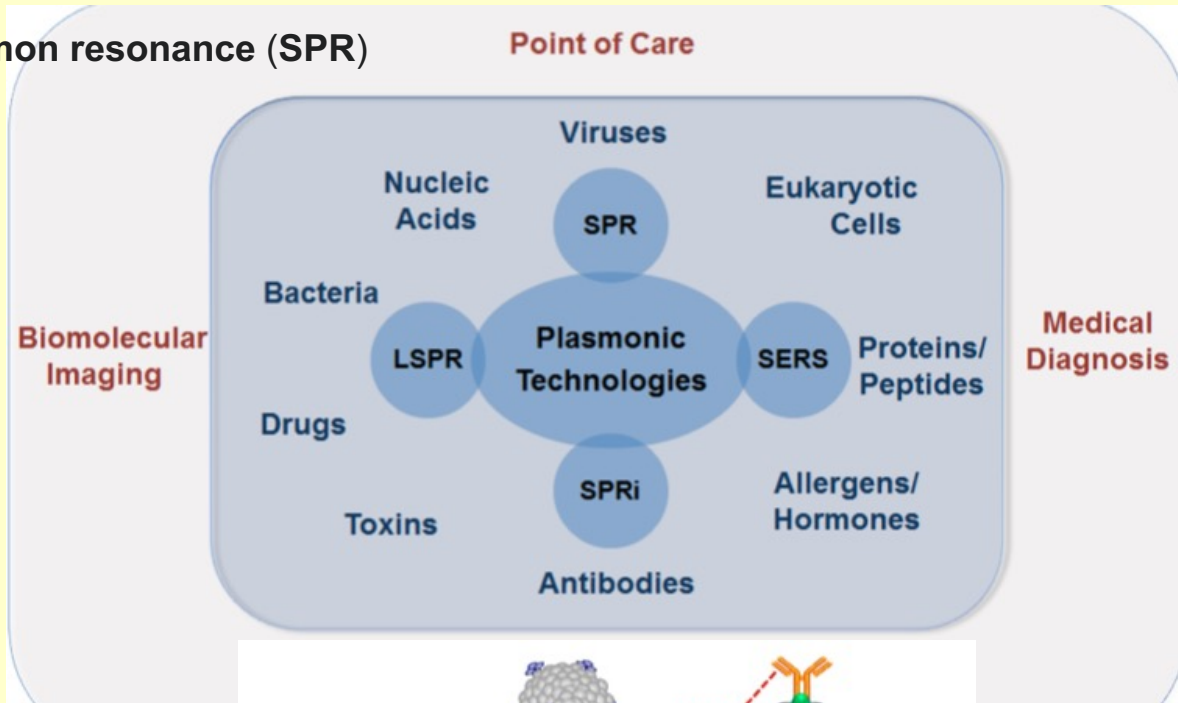


A scheme of oxidation of OPD catalyzed by horseradish peroxidase (HRP) (1.1) and autosensitized by 2, 3-diaminophenazine (DAP) (1.2).

→ Adicionar ácido sulfúrico para parar a reação

Biosensores

Surface plasmon resonance (SPR)



[dx.doi.org/10.1021/cr4000623](https://doi.org/10.1021/cr4000623) | Chem. Rev. 2014, 114, 5728–5752

A comprehensive review on plasmonic-based biosensors used in viral diagnostics
COMMUNICATIONS BIOLOGY | (2021)4:70 | <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01615-8> |
www.nature.com/commsbio

Detecção de genomas virais

Extração/exposição dos ácidos nucleicos da amostras

Técnicas de Hidridação:

Southern blots (DNA), Northern blots (RNA), Dot blots (DNA/RNA),
Hibridação "In situ" (células/tecidos)

Fixação a suporte sólido (ex.: membranas de nitrocelulose, lâminas)

Desnaturação e pareamento a sondas específicas (trechos de DNA ou RNA
com sequencias complementares a sequencias do genoma viral)

Detecção das sondas retidas, que devem possuir uma forma de detecção
(ex.: radioativas, ligadas a fluoróforos ou enzimas)

Obs: assumimos que foram vistas na disciplina de Biologia Molecular

Técnicas de amplificação:

PCR (Polimerase chain reaction), para vírus com genoma de DNA

RT-PCR (transcrição reversa seguida de PCR), para vírus com genoma de RNA

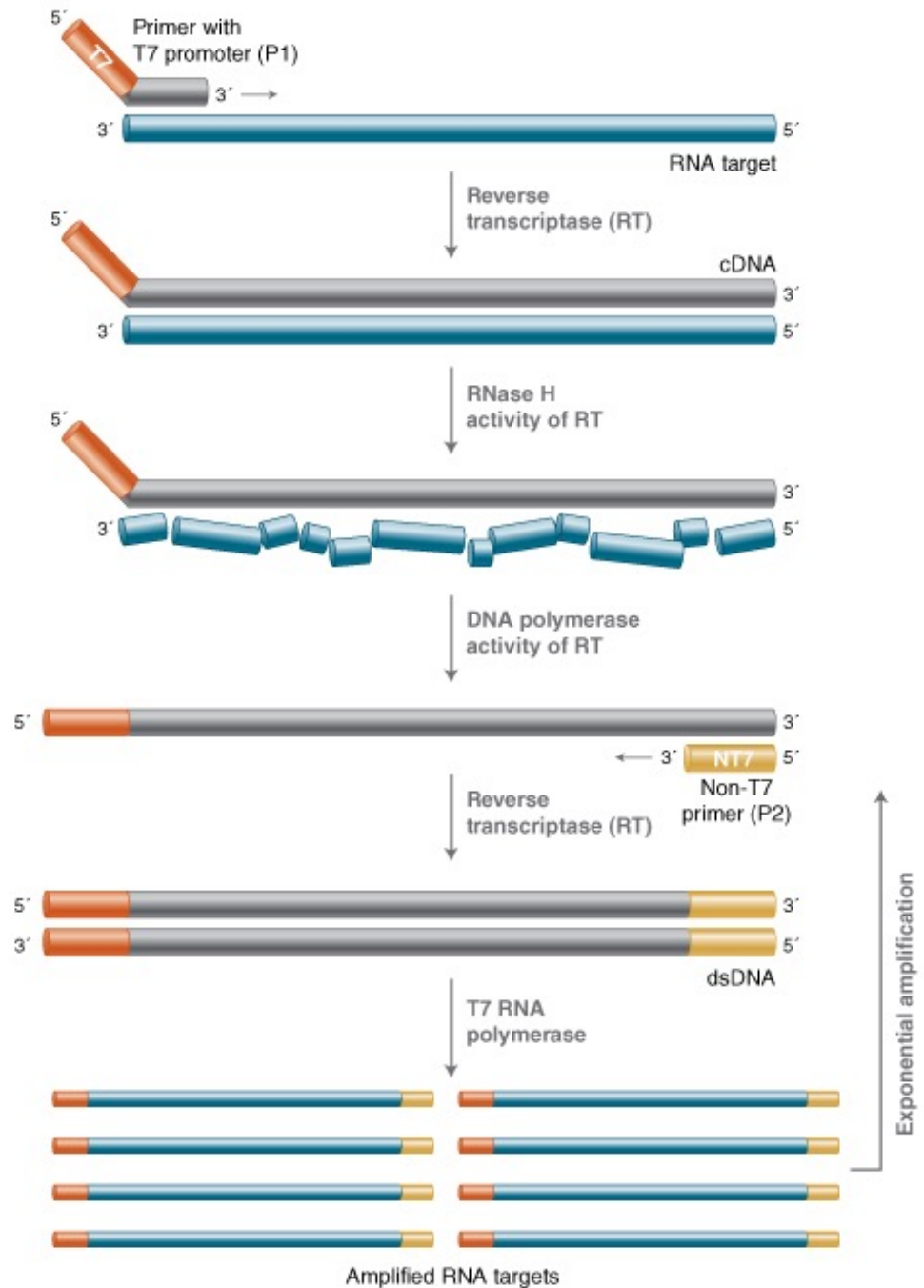
Real Time, dessas técnicas podem ser usados para quantificação de genomas virais

(assumimos que essas técnicas foram vistas na disciplina de Biologia Molecular)

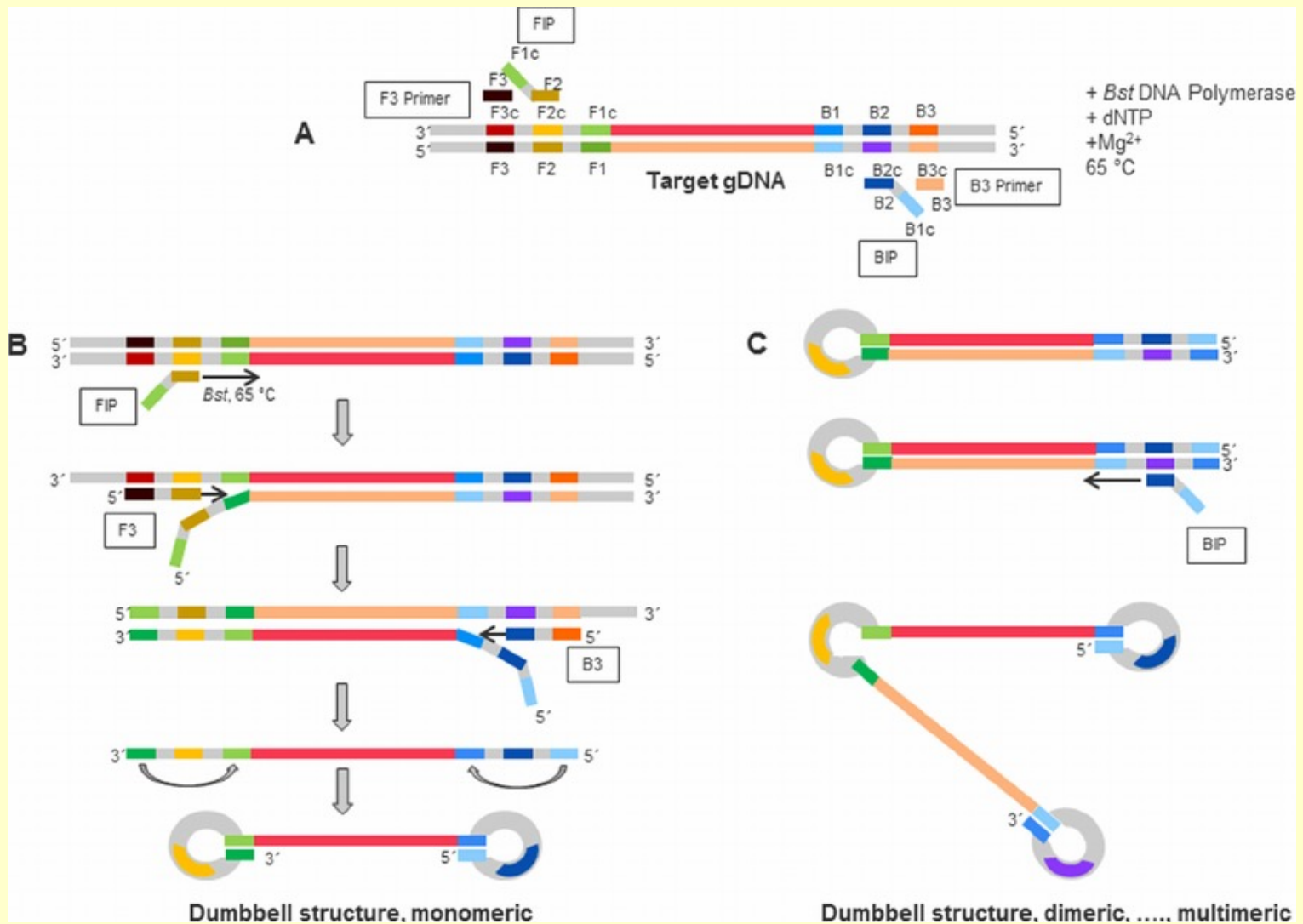
Técnicas de amplificação:

NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification)

para genomas de RNA



LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

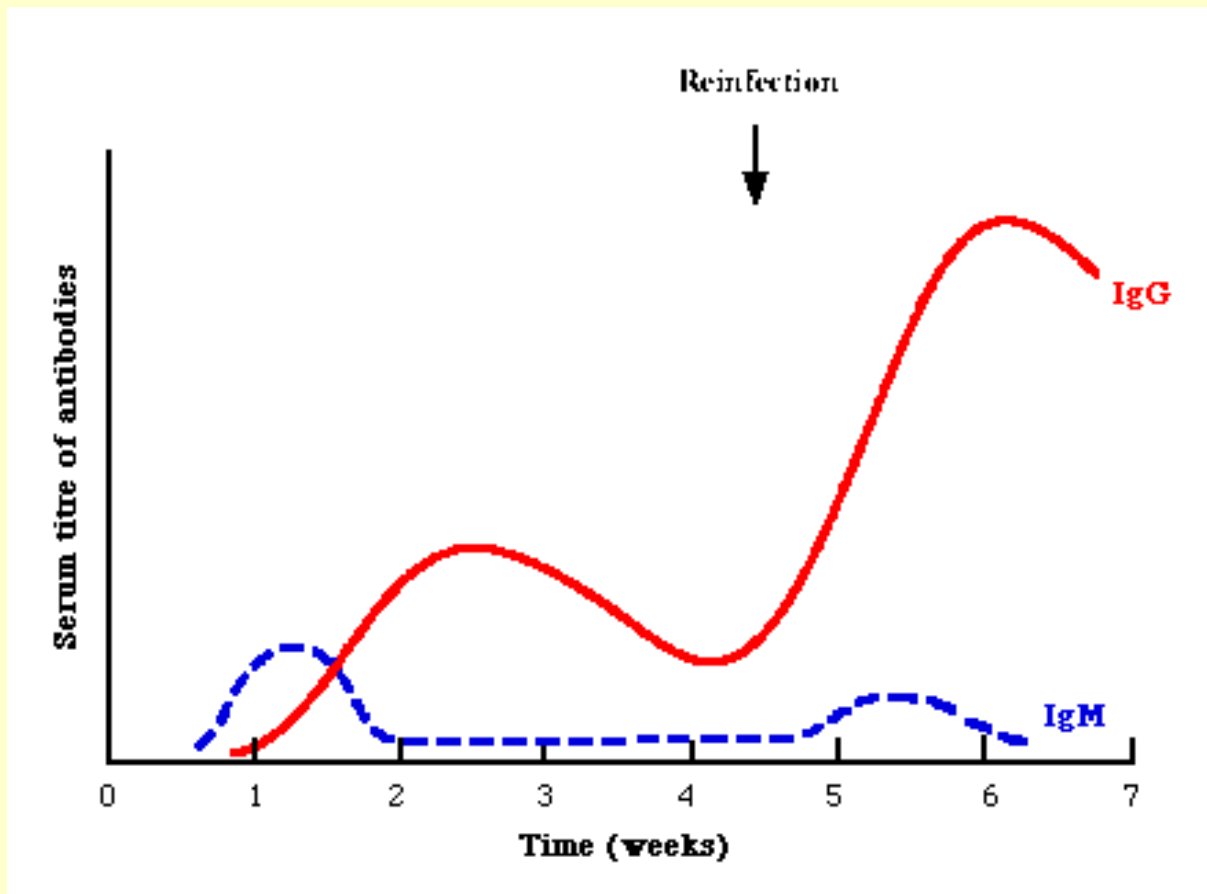


Niessen, Applied Microbiology and Biotechnology 99(2) 2014

<https://youtu.be/L5zi2P4lggw> New England Biolabs

Kits detecção colorimétrica em 30 minutos, várias marcas em uso para Covid19

Perfil sorológico típico após infecção aguda



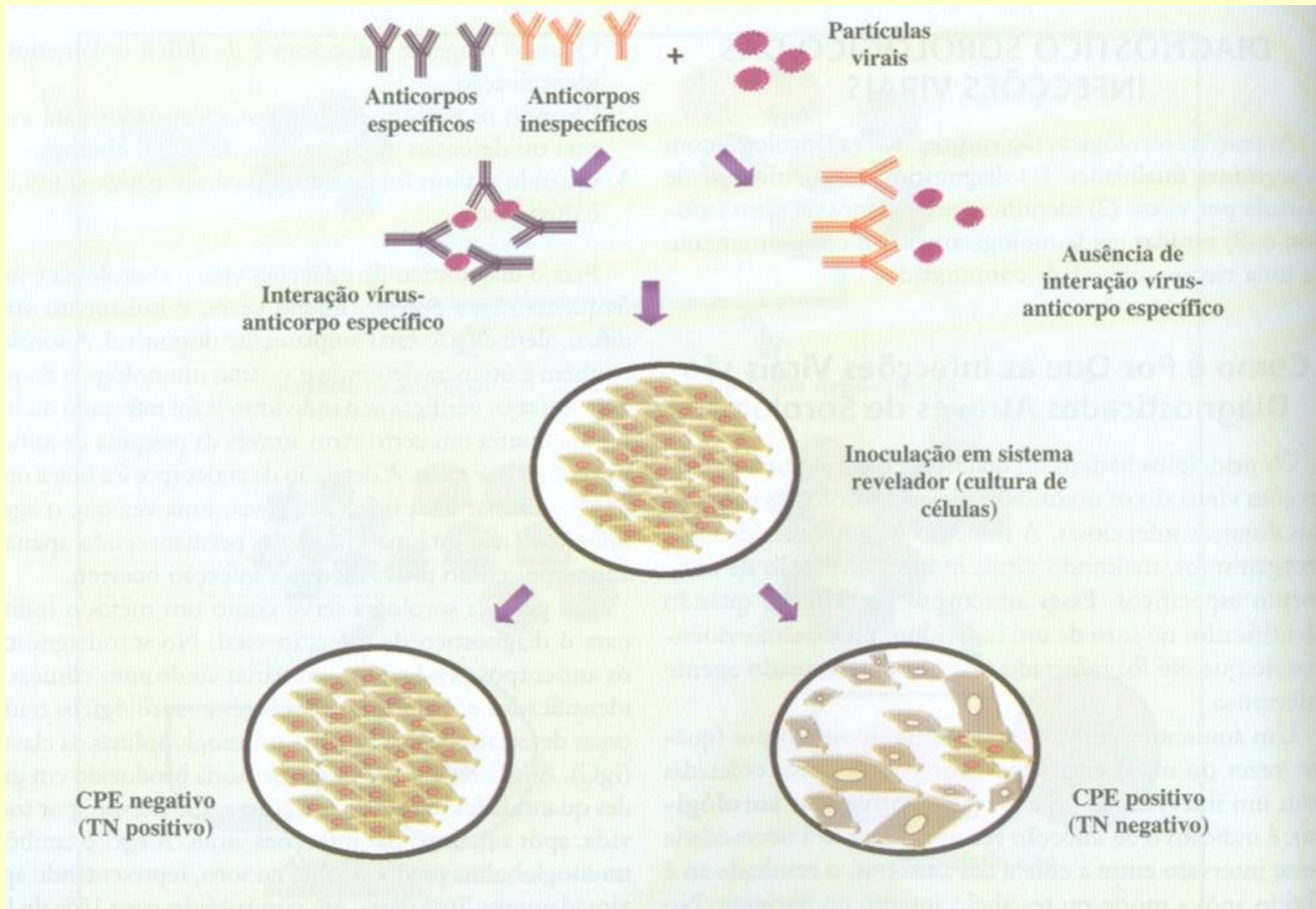
Durante a reinfecção, IgM pode estar ausente ou presente em baixos níveis de forma transiente

Sorologia

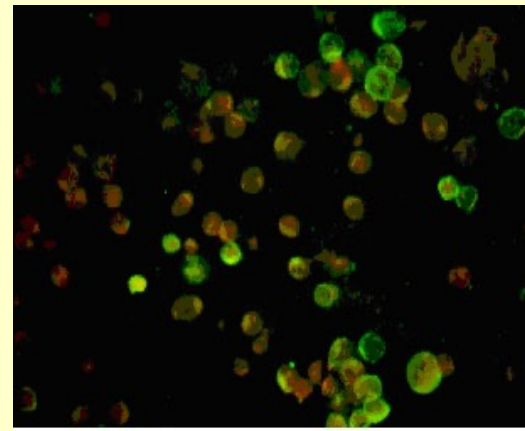
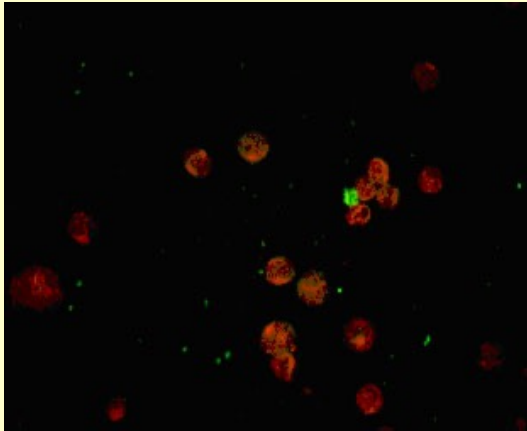
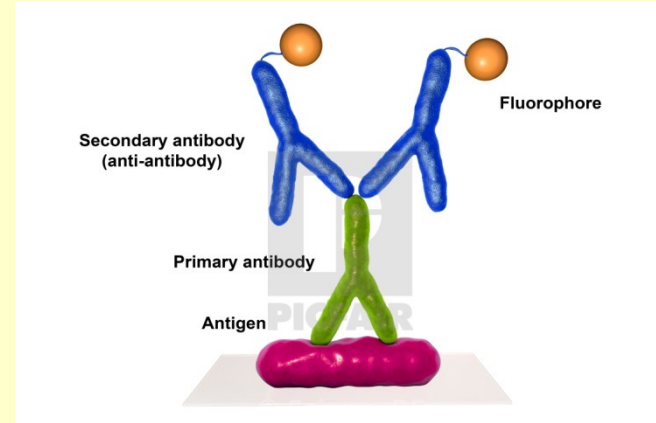
Detecção de anticorpos específicos no sangue. Evidenciar aumento nos títulos desses anticorpos entre as fases aguda e convalescente da infecção, ou a detecção de IgM na infecção primária.

- 1. Neutralização**
- 2. Imunofluorescência indireta**
- 3. Imunocromatografia**
- 4. Inibição de Hemaglutinação**
- 5. ELISA**
- 6. *Western Blot***

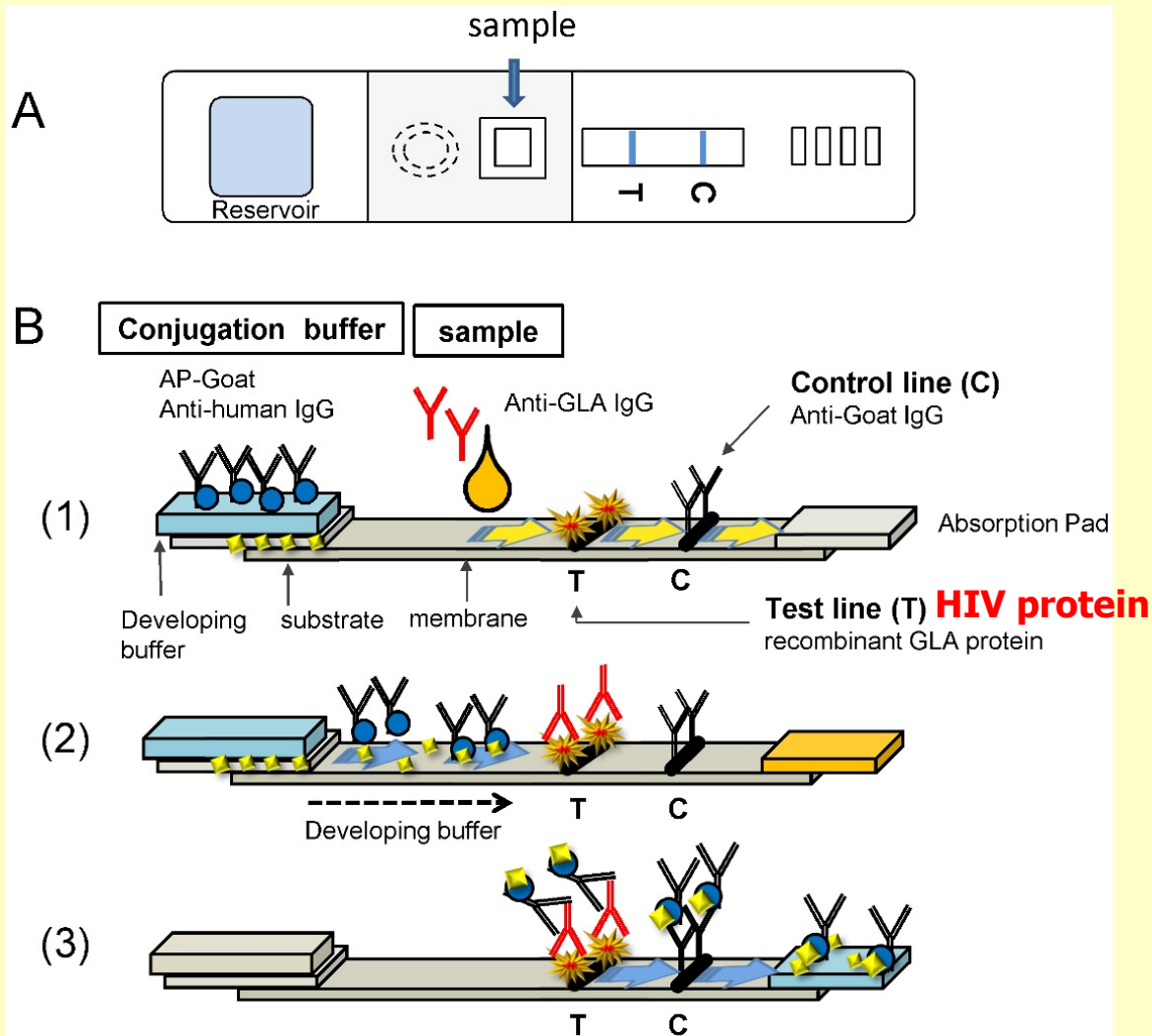
Neutralização



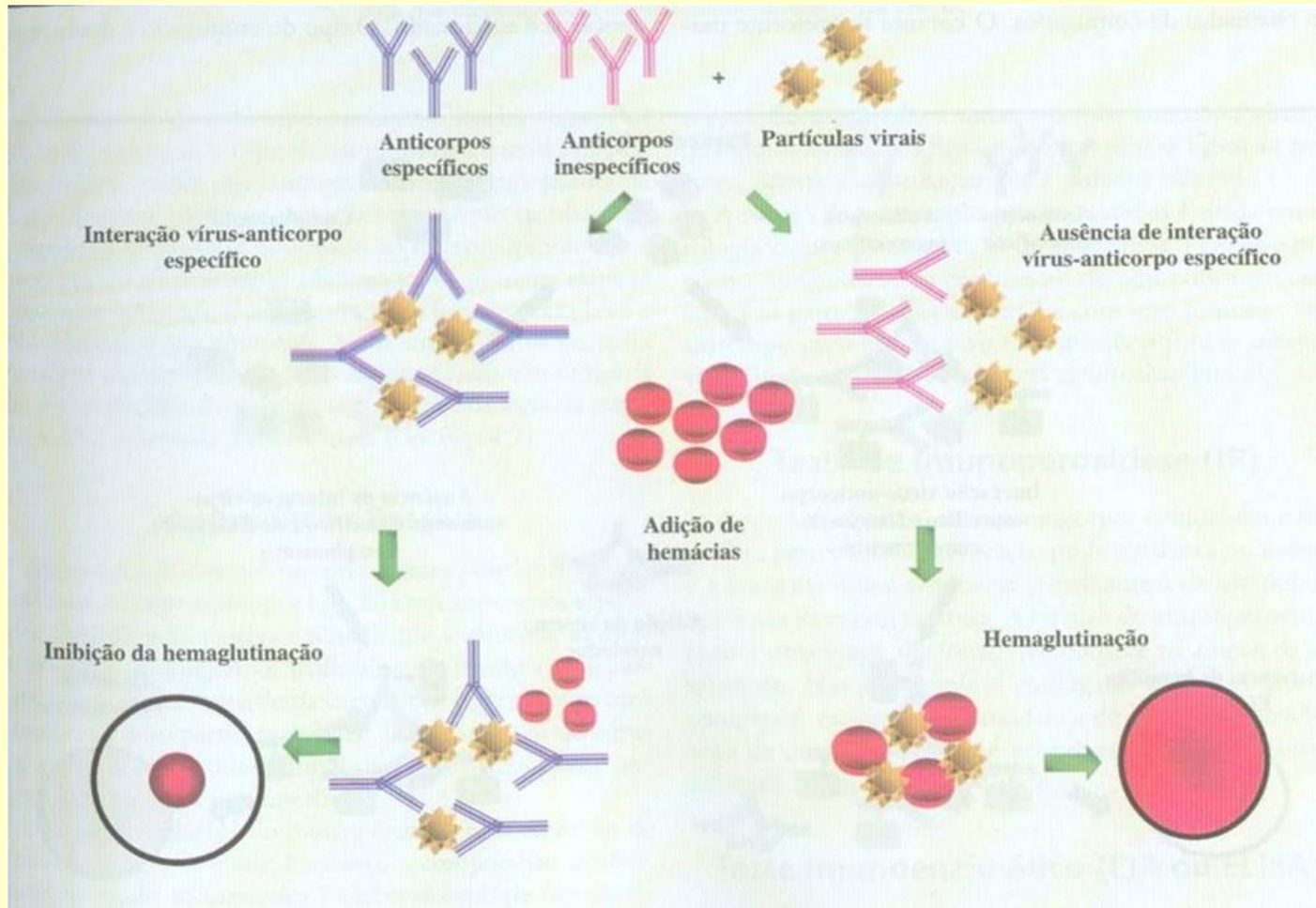
Imunofluorescência Indireta



Imunocromatografia (detecção de anticorpos)



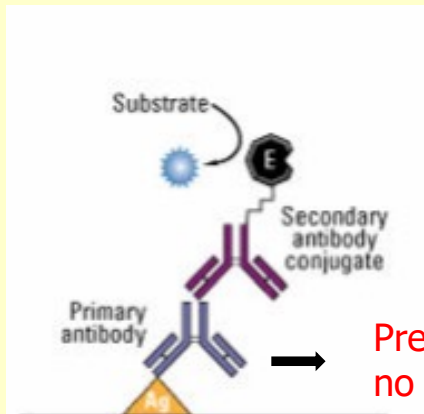
Inibição da hemaglutinação



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 ₂ N ₁)	A	○	○	○	○	○	○	○	○
	C	○	○	○	○	○	○	○	○
Influenza A / Canton 00 (H ₃ N ₂)	A	○	○	○	○	○	○	○	○
	C	●	●	●	●	●	●	●	○
Influenza B / Osaka/99	A	●	●	○	○	○	○	○	○
	C	●	●	○	○	○	○	○	○

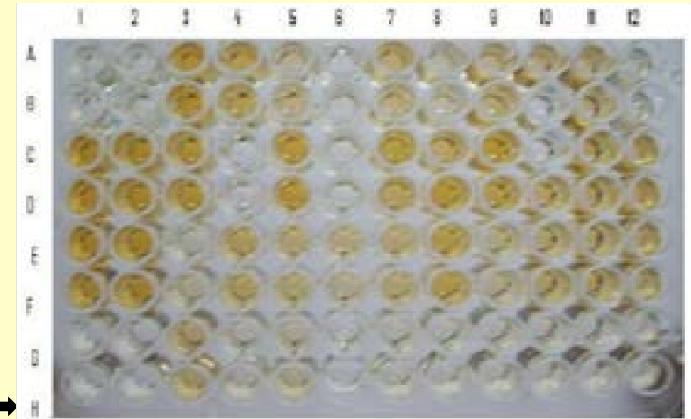
Fase da doença		Diluição do soro				
		1/2	1/4	1/8	1/16
Aguda	A					
Convalescente	C					

Determinação de anticorpos anti-virais através do ensaio imunoenzimático ELISA (indireto)



Presente no soro?

Vírus padrão fixado a suporte sólido



Automatização de leitura

Soro dos pacientes (primário), diluído, é colocado nos pocinhos
Após incubação é feita lavagem com tampão

+ anticórprio específico contra anticórprio humano conjugado à peroxidase (secundário)
Após incubação é feita lavagem com tampão

+ substrato H_2O_2 , gera H_2O e $O\bullet$, que ataca OPD incolor, gerando DAP (amarelo)
Adicionar ácido sulfúrico para parar a reação

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

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.

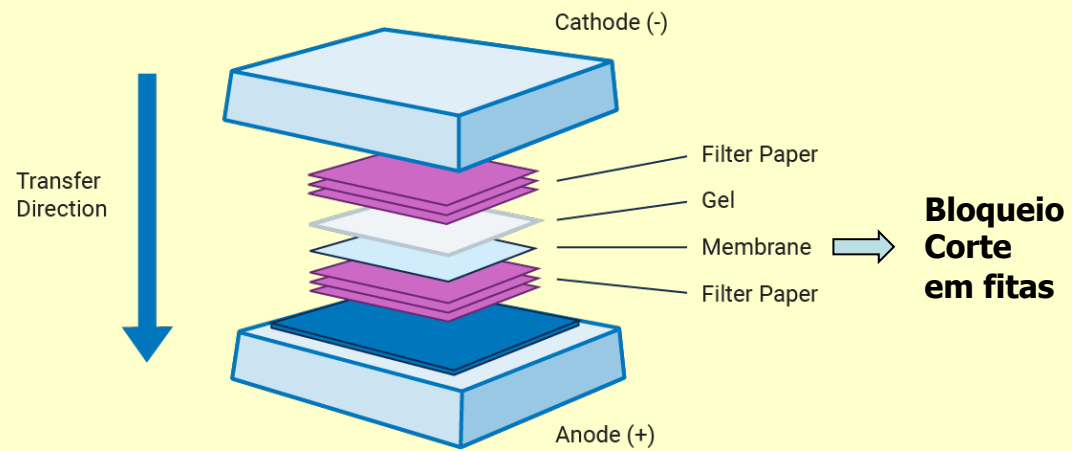
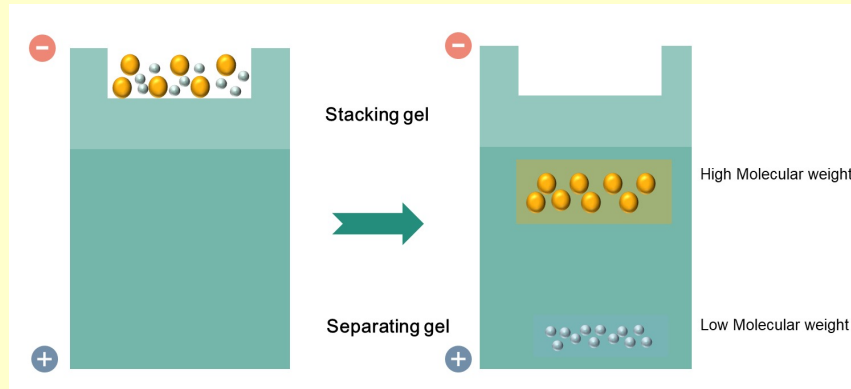
Os extratos proteicos são aplicados num gel de SDS-poliacrilamida.

As proteínas virais são separadas de acordo com o peso molecular, através de eletroforese.

As proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose ou nylon, em cuba de transferência, por aplicação de uma corrente elétrica.

A membrana é então lavada, bloqueada (com proteínas, ex: leite, para minimizar a ligação inespecífica de imunoglobulinas), cortada em fitas e acondicionada.

Gel preparativo

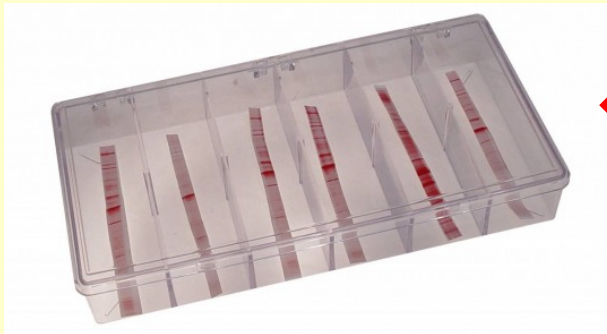


Para cada amostra de soro é utilizada uma fita em separado. As fitas de nitrocelulose são incubadas na presença do soro ou plasma dos pacientes, assim como, com os soros controles, por 2 hs a 37°C.

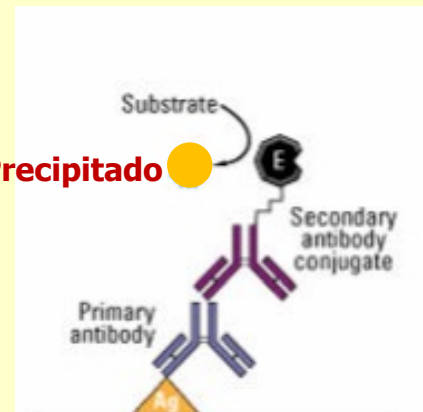
A seguir, as fitas são lavadas, por 3 vezes, com tampão fosfato contendo Tween 20.

Para detectar a presença dos anticorpos, é adicionado soro de cabra anti IgG humana, conjugado à peroxidase e as fitas são incubadas por 30 min. a 37°C, e lavadas.

A reação é revelada com solução de substrato: tampão citrato contendo H₂O₂ e **4-cloro-1-naftol** (cromógeno, forma precipitado), por 10 a 15 minutos à temperatura ambiente, e lavadas com água.

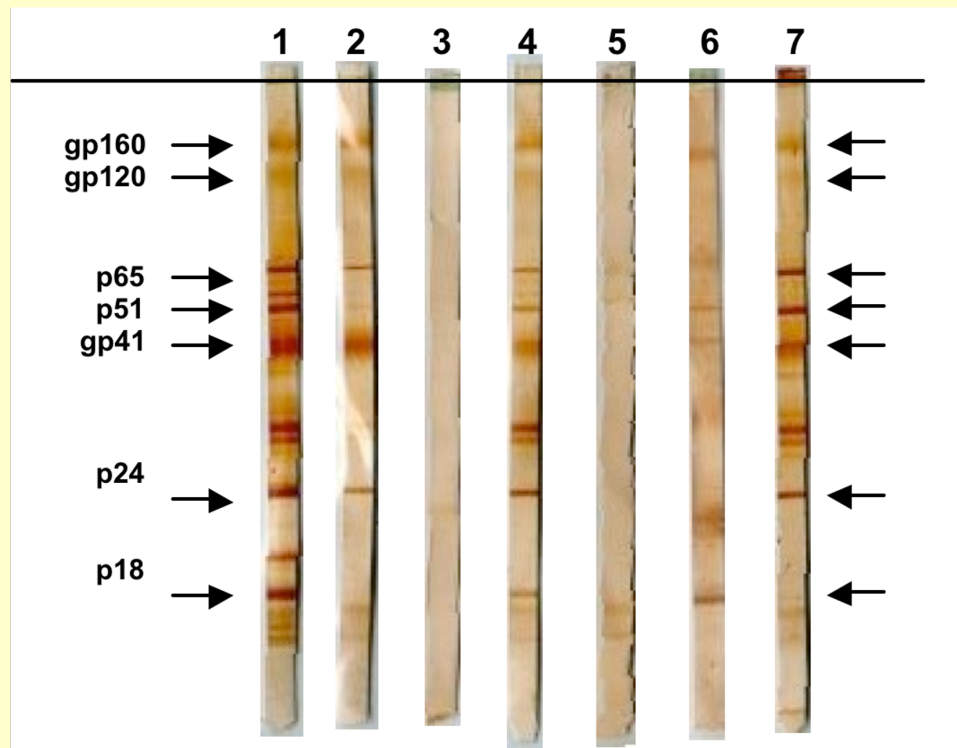


Precipitado



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).



1 – Controle Positivo Forte; 2- Controle Positivo Fraco; 3 – Controle Negativo; 4 – 7 soros de pacientes

Padrão observado	Resultado
Nenhuma banda presente	Negativo
Uma banda presente em gp4 ou gp120/160, e a banda p24 presente. Normalmente gp120/160 e gp 41 apresentam-se difusas.	Positivo para HIV-1
Bandas presentes com padrão diferente do esperado	Indeterminado

Guia de estudos

Quais as semelhanças e diferenças dos testes de imunofluorescência direta indireta?

Como conectar as reações de hemaglutinação e inibição de hemaglutinação num protocolo para diagnóstico do vírus Influenza?

Porque as estratégias de aglutinação passiva e imunocromatografia têm potencial de aplicação diversificada em diagnóstico viral mas, por outro lado perdem em especificidade e precisão?

Como você vê o potencial dos biosensores em diagnóstico viral?

Como a amplificação gênica pode facilitar o diagnóstico viral?

Quais as semelhanças e diferenças dos testes de ELISA e Western Blot?

Porque o protocolo de Western blot para diagnóstico de HIV pode ser considerado bastante específico e confiável?