

CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

BRUNA NATACHA DO NASCIMENTO E SILVA

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA INFECÇÕES VIRAIS E SUA
IMPORTÂNCIA NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS: UMA
REVISÃO DE LITERATURA**

Juazeiro do Norte – CE
2020

BRUNA NATACHA DO NASCIMENTO E SILVA

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA INFECÇÕES VIRAIS E SUA
IMPORTÂNCIA NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS: UMA
REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Clínica do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção de grau de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientadora: Prof. Ma. Tassia Thaís Al Yafawi

*Dedico este trabalho de conclusão de curso a minha mãe e ao meu pai (in
memorian) com amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, fazendo com que meus objetivos fossem alcançados, durante todo o período de estudos, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho. Aos familiares e amigos, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuiu para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço ao meu esposo e companheiro Júlio Lossio, por ter me incentivado a não desistir e sempre me apoiar em todas as situações. Aos meus filhos, Alice Valentina e Kaleo Messi, por serem minha inspiração e meus motivos de nunca desistir. A professora Tássia Thais, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade. Aos professores, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso. Às pessoas com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica. À UNILEÃO que foi essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo do curso.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA INFECÇÕES VIRAIS E SUA IMPORTÂNCIA NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Bruna Natacha do Nascimento e Silva ¹

Tassia Thais Alencar ²

RESUMO

Os vírus são patogênicos aos seres vivos. Ao invadirem as células de um indivíduo, eles prejudicam o funcionamento normal dessas células e, conseqüentemente, provocam doenças. Até recentemente, o diagnóstico laboratorial das viroses não era realizado em laboratórios clínicos e hospitais, pois as técnicas utilizadas eram muito lentas e caras. Com o surgimento de diversos vírus e infecções acometidas pelos mesmos e o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e de drogas antivirais eficientes, a virologia diagnóstica teve um grande desenvolvimento. Avanços biotecnológicos na área da virologia nos permitem identificar os efeitos citopatológicos, isolar vírus, detectar componentes virais e avaliar resposta imune por meio de inúmeros ensaios laboratoriais. As técnicas de diagnóstico são um dos recursos mais importantes no trabalho de prevenção às infecções virais. Nesse artigo será destacado algumas técnicas que vem sendo muito utilizadas no diagnóstico de diversas infecções virais.

Palavras-chave: Diagnóstico. Vírus. Tecnologia.

ABSTRACT

Viruses are pathogenic to living beings. By invading an individual's cells, they impair the normal functioning of these cells and, consequently, cause disease. Until recently, laboratory diagnosis of viruses was not performed in clinical laboratories and hospitals, as the techniques used were very slow and expensive. With the emergence of several viruses and infections affected by them and the development of faster techniques and efficient antiviral drugs, diagnostic virology has had a great development. Biotechnological advances in the field of virology allow us to identify the cytopathological effects, isolate viruses, detect viral components and evaluate the

immune response through numerous laboratory tests. Diagnostic techniques are one of the most important resources in the work of preventing viral infections. In this article, some techniques that have been widely used in the diagnosis of various viral infections will be highlighted.

Keywords: Diagnosis. Virus. Technology.

1. INTRODUÇÃO

As propriedades físico-químicas dos vírus os tornam capazes de infectar o organismo através de receptores de membrana específicos, presentes nas células hospedeiras. O fato de o vírus apresentar tropismo celular vai influenciar no tipo de doença causada (Stephens et al., 2009).

Quando as células são atacadas por vírus, o sistema de defesa do organismo parasitado passa a produzir anticorpos específicos que combatem o vírus invasor. Isso ocorre porque os vírus são formados por proteínas diferentes das do organismo parasitado. Estas proteínas são reconhecidas como não próprias do organismo e são neutralizadas pelos anticorpos. Assim, caso o mesmo vírus invada o organismo novamente, a memória imunológica desencadeará rapidamente uma resposta imune específica contra o vírus, e a doença não se instalará (Cruvinel, et al.,2010).

As principais ameaças à saúde humana vieram de vírus animais que infectam humanos. Os fatores e condições que contribuem para emergência e disseminação geográfica das zoonoses são complexos, e podem estar relacionadas a um único evento, ou cadeia de várias etapas que pode ser influenciada pela evolução genética do patógeno, mudanças climáticas e do meio ambiente, características antropológicas, demográficas, movimento e comportamento de pessoas, animais e vetores (Plowright, et al.,2017).

O diagnóstico das infecções virais emergiu nas últimas décadas como uma importante ferramenta na medicina, contribuindo de forma efetiva na identificação do patógeno, direcionando o tratamento da doença. Até recentemente o diagnóstico das viroses não era realizado em laboratórios clínicos ou hospitais, pois as técnicas

utilizadas eram muito lentas e caras, os reagentes não estavam disponíveis e não se tinha ainda tratamento para as infecções virais, limitando a utilidade dos testes diagnósticos (Brasil, 2002).

Avanços biotecnológicos na área da virologia nos permitem identificar os efeitos citopatológicos, isolar vírus, detectar componentes virais e avaliar resposta imune por meio de inúmeros ensaios laboratoriais. As técnicas de diagnóstico são um dos recursos mais importantes no trabalho de prevenção às infecções virais (Simões, 2020).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Dentre as técnicas mais utilizadas no diagnóstico laboratorial de infecções virais destacam-se o isolamento e identificação do vírus, a sorologia para detecção de antígenos virais e/ou anticorpos específicos, a detecção direta da partícula viral e a amplificação de ácidos nucleicos (Simões, 2020).

2.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL

No isolamento viral, a escolha do sistema de propagação para o vírus pesquisado é o determinante essencial. Uma vez o vírus inoculado no sistema hospedeiro suscetível, o vírus provoca alterações morfológicas denominado efeito citopático (CPE, do inglês cytopathogenic effect) que são observadas como alterações na morfologia de células individuais ou em grupo de células induzidas pela infecção viral. Diversos sistemas hospedeiros têm sido utilizados para a propagação de vírus em laboratório como animais de experimentação, ovos embrionados e cultura de células (Santos, 2015).

2.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS INFECÇÕES VIRAIS

Dentre os métodos sorológicos utilizados, temos a imunofluorescência direta e indireta, o teste de neutralização, teste imunoenzimático (Elisa), teste imunocromatográfico e o immunoblotting ou Western blotting.

2.2.1. Imunofluorescência direta e indireta

A técnica de imunofluorescência utiliza anticorpos marcados com corantes fluorescentes para revelar a formação de um imunocomplexo vírus-anticorpo. Existem dois tipos de imunofluorescência: direta (usada para identificação de muitos antígenos virais) e indireta (usada para identificação de antígenos ou anticorpos) (Kimura & Junior, 2019).

Na imunofluorescência direta detecta-se o antígeno pesquisado propriamente dito utilizando os marcadores fixados com fluorocromos (Aoki, et Al.,2010).

A imunofluorescência indireta baseia-se no princípio de uma dupla camada, é utilizada na detecção de anticorpos por antígenos impregnados em uma lâmina, onde se aplica primeiramente um anticorpo específico não fluorescente. Por fim, coloca-se um anticorpo fluorescente com especificidade marcada contra determinados antígenos do primeiro anticorpo usado para reagir com o antígeno (Aoki, et Al.,2010).

2.2.2. Teste de neutralização

O teste de neutralização é considerado o Teste mais sensível e mais específico para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes, sendo o método de referência para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação (Simões, 2011).

O teste de neutralização por redução de placas pode ser utilizado para identificação do antígeno viral ou para avaliação do nível de anticorpos. Experimentalmente, amostras de soro de primatas não-humanos que receberam ou não anticorpos monoclonais foram investigados quanto a capacidade de neutralizar o vírus Zika (Simões, 2020).

2.2.3. Imunoenzimático

A reação imunoenzimática também denominada ELISA, do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay, envolve as etapas de formação de imunocomplexo (antígeno-anticorpo), adição do conjugado (anticorpo-enzima), sucessivas lavagens e posterior revelação (adição do substrato e reação de cor). A leitura do ensaio é

realizada pela absorbância após a adição da solução de interrupção (stopping solution) através do espectrofotômetro (Simões et al., 2011).

Este teste é usado para diversos testes em um laboratório, como para detectar doenças autoimunes (ex.: Artrite Reumatóide), alergias, patologias que desencadeiam produção de imunoglobulinas, doenças infectas contagiosas (ex.: Doença de Chagas, HIV), dosagem de hormônios (ex.: teste de gravidez, T3, T4, testosterona, estradiol e progesterona), marcadores tumorais e proteínas séricas, doenças virais, doenças bacterianas e de protozoários (ex.: Rubéola, Toxoplasmose e Herpes). E para atender essas diversas funções, tem-se diversos tipos de teste (Minozzo, 2004).

2.2.4. Imunocromatográfico

O teste imunocromatográfico ocorre por capilaridade em uma membrana de nitrocelulose pelo fluxo lateral da amostra. É um teste rápido e de fácil detecção com diversas opções disponíveis comercialmente. A interpretação do resultado é simples sendo considerado positivo quando as duas linhas (teste e controle) são detectadas indicando que o vírus presente na amostra reagiu com o conjugado formando um imunocomplexo (Santos, 2015).

2.2.5. Immunoblotting ou Western blotting

Immunoblotting é um teste altamente sensível e específico gerando interpretações subjetivas em alguns resultados. Consiste na separação de proteínas virais por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo o detergente duodecil sulfato de sódio (SDS). As proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose para detecção de anticorpos conjugados com enzima e posterior revelação do substrato associado a um cromógeno. Em um dos experimentos, amostras obtidas das transfecções de células foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) utilizando o sistema Miniprotean III (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. Os géis foram corados por coloração com coomassie blue ou utilizando o método com nitrato de prata. Após a eletroforese os géis foram submetidos à transferência para membranas Hybond-P

PVDF (GE-HealthCare, Alemanha), utilizando o sistema semi-dry (BioRad, USA) (Simões et al., 2011).

2.3. DETECÇÃO DIRETA DA PARTÍCULA VIRAL;

A detecção, visualização e identificação de partículas pseudovirais chamadas particles like-virus (VLP), têm sido analisadas microscopicamente assim como a morfologia ultraestrutural das linhagens celulares SiHa e HeLa por microscopia eletrônica de transmissão (Simões et al., 2015). Para otimização dos resultados, diversos protocolos têm sido descritos e modificados ao longo do tempo (Simões,2020).

2.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES VIRAIS

Podemos destacar a Reação em cadeia da polimerase (PCR), Amplificação por círculo rolante, 3D Cell -SELEX, DNA Microarray, RNA-sequencing e Clonagem.

2.4.1. Reação em cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da Polimerase (polymerase chain reaction) – PCR, é uma técnica que amplifica sequências específicas do ácido nucleico. Se o genoma é um RNA viral, é necessário converter em DNA complementar (cDNA) utilizando a enzima transcriptase reversa (RT-PCR) para iniciar o processo de amplificação em escala exponencial. A reação cíclica de PCR envolve três etapas clássicas: desnaturação das fitas de DNA, hibridização dos oligonucleotídeos à sequência alvo, e extensão das fitas pela ação da DNA polimerase usando os dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato) como substrato da reação (Simões et al., 2016).

2.4.2. Amplificação por círculo rolante

O genoma de novos vírus DNA como poliomavírus e papilomavírus humano têm sido caracterizados pela técnica de amplificação por círculo rolante (rolling circle amplification – RCA), que utiliza oligonucleotídeos randômicos e a enzima polimerase do fago com atividade proofreading para a síntese de novas fitas. Após a

circularização do genoma, os produtos amplificados podem ser digeridos por endonucleases de restrição, clonados e posteriormente sequenciados para caracterização genômica (Santos, 2015).

2.4.3. 3D Cell -SELEX

Aptâmeros são pequenas moléculas de DNA ou RNA sintetizadas quimicamente selecionadas *in vitro* pela técnica SELEX, do inglês Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment que apresentam uma estrutura tridimensional. Essas moléculas possuem alta especificidade e afinidade contra alvos de interesse podendo atuar como nanopartículas em estudos oncológicos ou mesmo marcados para detecção de focos infecciosos em infecções pós-cirúrgicas. Diversos modelos de estudos selecionam e caracterizam os aptâmeros considerados análogos dos anticorpos monoclonais, como sendo candidatos promissores para diversas aplicações terapêuticas em infecções virais. Essa nova técnica é a combinação das culturas de células em 3D com a seleção de sequências curtas de oligonucleotídeos a partir de uma biblioteca de ligantes específicos no reconhecimento de alvos terapêuticos (Sousa, 2016).

2.4.4. DNA Microarray

Antes mesmo das análises de expressão gênica em larga escala, já existiam outras técnicas envolvidas na análise de transcritos descritos como EST, do inglês expressed sequence tags e SAGE, serial analysis of gene expression. Tais técnicas foram substituídas gradativamente para o microarranjo de DNA (DNA microarray) com a utilização de sondas curtas ou longas que hibridizavam com determinados transcritos conhecidos para a genotipagem ou na detecção de vírus respiratórios, por exemplo (Kremer, 2019).

2.4.5. RNA-sequencing

O RNA-sequencing (RNA-seq) é uma técnica que analisa a quantidade de sequências de RNAs em uma amostra usando a plataforma NGS. Em outras palavras, a análise do transcriptoma destina-se ao perfil de todos os RNAs, incluindo mRNA,

rRNA e tRNA para mensurar a expressão de genes simultaneamente (expressão gênica diferencial), capaz de identificar os genes que estão sendo mais expressos (up regulated) ou menos expressos (down regulated) em um determinado momento dos processos biológicos (Kremer, 2019).

2.4.6. Clonagem

O avanço de técnicas que permitiram a manipulação do DNA revolucionou a biologia molecular. A clonagem é uma técnica que consiste em isolar um fragmento de DNA e inserir em outra célula hospedeira, com capacidade de replicação independente resultando em uma molécula de DNA recombinante. Geralmente o isolamento e a caracterização de genes específicos têm sido inseridos em vetores plasmidiais. Conceitualmente, plasmídeo é um DNA circular extracromossômico presente em bactérias contendo genes de resistência a determinados antibióticos. O plasmídeo recombinante carreando o gene de interesse é inserido em uma bactéria transformada após sofrer o processo de choque térmico ou eletroporação. O sucesso das clonagens pode ser conferido com as enzimas de restrição também chamadas de endonucleases que funcionam como tesouras genéticas com capacidade de reconhecer e clivar sítios específicas do DNA (Simões,2020).

3. METODOLOGIA

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo em questão foi desenvolvido a partir do método da revisão integrativa da literatura, que tem como finalidade reunir as informações científica do tema pesquisado de forma resumida, contribuindo para o conhecimento acerca da temática (NÓBREGA; JÚNIOR; CARMO, 2019).

3.2. FONTES DE INFORMAÇÃO

Para a seleção dos artigos científicos, utilizaram-se as bases de dados Google Acadêmico e *Eletronic Library Online* (SciELO); os descritores usados para a busca de materiais foram: Diagnostico para infecções virais, Virologia e Microbiologia médica, no qual foram cominados entre si para melhores resultados de busca.

3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para a construção do artigo foram incluídos artigos que abordassem os meios de diagnóstico das infecções virais e suas tecnologias, que tivessem sido publicados em português e inglês, entre os anos de 2009 a 2020. Enquanto os materiais que apresentassem acesso mediante pagamento ou tivessem outra planta como foco, foram excluídos.

3.4. ANÁLISE DE DADOS

Para a revisão integrativa foi realizada uma análise através de uma leitura detalhada dos artigos selecionados, a fim de verificar a aderência do objetivo da pesquisa em questão, assim, os artigos foram organizados de acordo com os objetivos, introdução, metodologias e conclusão, objetivando obter as diretrizes da revisão integrativa.

4. CONCLUSÃO

Os diagnósticos laboratoriais são de grande importância para detecção desses vírus e para a avaliação da saúde das pessoas. Conforme o vírus detectado, é possível iniciar pesquisas para produção de antivirais, vacinas e tratamentos adequados o mais rápido possível, evitando o uso indiscriminado de medicamentos ineficazes, o que faz toda a diferença inclusive em desfecho clínico e na diminuição de mortalidade.

REFERÊNCIAS

Aoki V.; Sousa, J.X.; Fukumori, L.M.; Perigo, A.M.; Freitas, E.L.; Oliveira, Z.N.P. **Imunofluorescência direta e indireta**. An Bras Dermatol. 2010;85(4):490-500.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília : FUNASA, 2002.

Cruvinel, Wilson de Melo; Mesquita Júnior, Danilo; Araújo, Júlio Antônio Pereira; Catelan, Tânia Tieko Takao; Souza, Alexandre Wagner Silva de; Silva, Neusa Pereira da; Andrade, Luís Eduardo Coelho. **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. Revista Brasileira de Reumatologia. 50 (4): 434–447. ISSN 0482-5004. doi:10.1590/S0482-50042010000400008. 2010.

Kimura, L.M.S., Junior, J.V.D. **Raiva**. In: Virologia Humana e Veterinária. Simões, R.S.Q (ed). Thieme Revinter: Rio de Janeiro, p: 305-316, 2019.

Kremer, F.S. **Análise de expressão gênica diferencial com RNA-seq (reference-guided)**. Omixdata, 2019.

MINOZZO, João Carlos. **Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra o Cysticercus bovis**. Cienc. Rural, Santa Maria , v. 34, n. 3, p. 857-864, June 2004 .

NÓBREGA, L. K. S.; JÚNIOR, F. P. A.; CARMO, E.S. Óleos essenciais com efeito sobre *Malassezia spp.*: uma revisão integrativa. **Revista de Biotecnologia & Ciência**. v.8, n.2, p. 45, 2019.

Plowright, R.K.; Parrish, C.R.; McCallum H.; Hudson, P.J.; Ko, A.I.; Graham, A.L.; Lloyd-Smith, J.O. **Pathways to zoonotic spillover**. Nat Rev Microbiol. 2017;15(8):502-510. doi: 10.1038/nrmicro.2017.45.

Santos, N.S.O. **Diagnóstico Laboratorial das Viroses**. In: Virologia Humana. 3ed. Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D (Eds). Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p: 101-140, 2015.

Simões, M. **AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA E CONFIABILIDADE DO TESTE SOROLÓGICO DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS DE LISE (MICRO PRNT) NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA**. Instituto de tecnologia em imunobiológicos. RIO DE JANEIRO, 2011.

Simões, R.S.Q et al. **Transient transfections of human cell lines HEK-293-T and HuH7 for production of HBsAg/HCV Chimeric protein: comparative detection using the Elisa and Western Blotting**. *Virus Reviews and Research*, 16:111-112, 2011.

Simões, R.S.Q. et al. **HPV DNA detection: Prevalence in sexually active women from Manguinhos, Rio de Janeiro State**. *Virus Reviews and Research*, 21:14-15, 2016.

SIMÕES, R.S.Q. **DIAGNOSTICS MEDICINE FOR VIRAL INFECTIONS**. Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil.2020.

Sousa, A.G et al. **3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line**. *Experimental Cell Research*, 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.015>.

Stephens, P.R.S. Oliveira, M.B.S.C.; Ribeiro, F.C.; Carneiro, L.A.D. **Virologia**. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em Laboratórios de saúde. Capítulo 2. 2009.