

Clase 2

Diagnóstico virológico

Dr Ruben F Iacono

Profesor Adjunto 2^a Cátedra de Microbiología

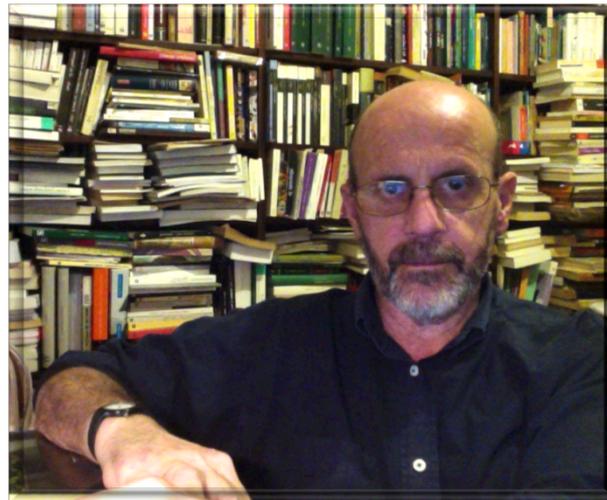
Facultad de Medicina

Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

rubeniacono@gmail.com



Patogenia

¿Qué es la patogenia viral?

Son todos los mecanismos o eventos desencadenados por un virus al infectar a un huésped. Estos conducen a una disfunción o daño de un tejido u órgano, llevando al huésped infectado a un estado de ***enfermedad***.

Enfermedad

Enfermedad

Toda anomalía en el organismo del huésped como consecuencia de la infección viral.

Algunas infecciones virales pueden no producir enfermedad en el huésped, a estas infecciones se las denominan “Subclínicas”.

Características de las enfermedades causadas por virus

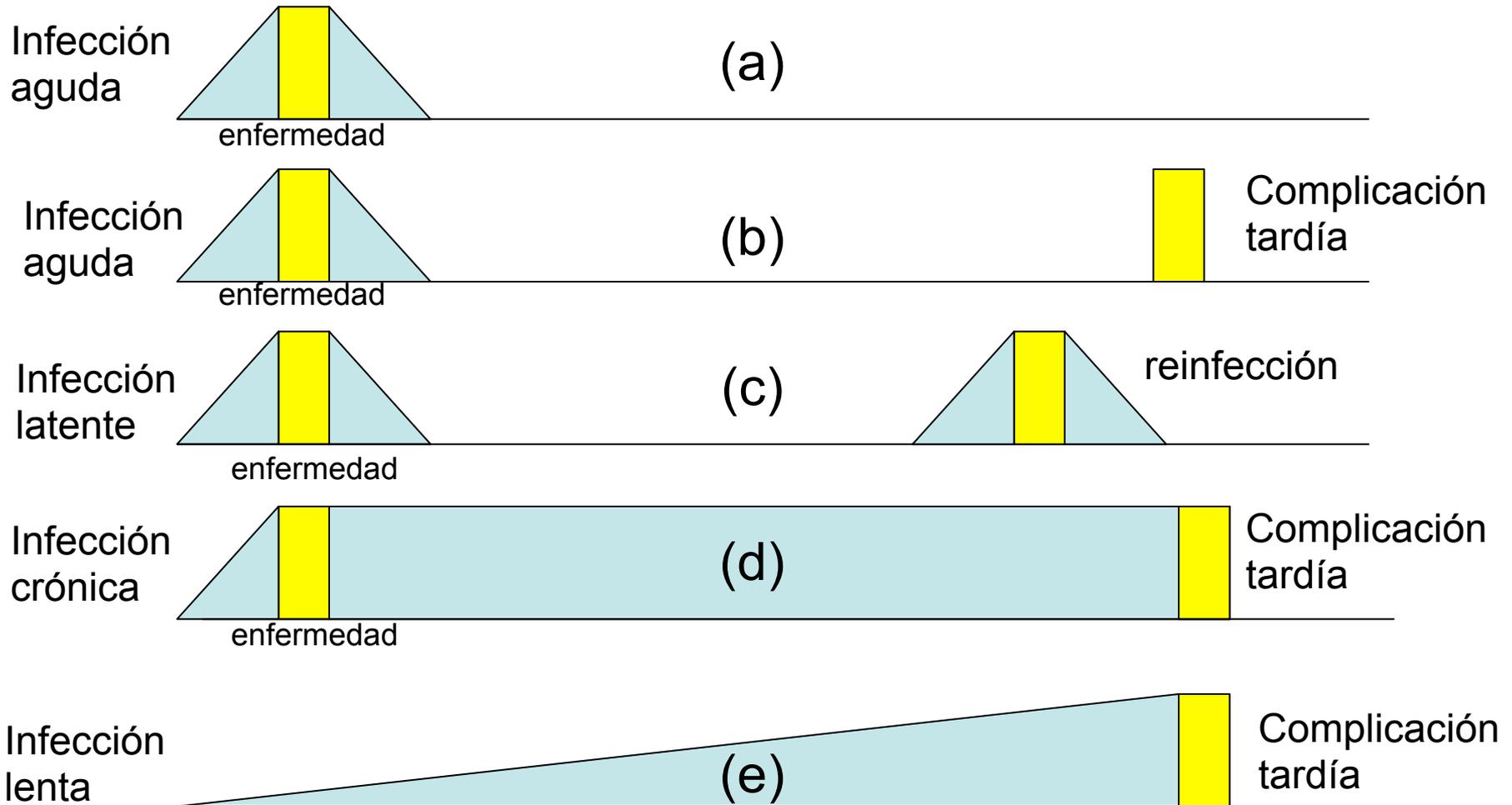
1. Muchas infecciones virales son subclínicas
2. Distintos virus pueden producir la misma enfermedad.
3. El mismo virus puede producir distintas enfermedades
4. La evolución de la enfermedad está fuertemente determinada por la interacción virus-huésped.

Pirámide patogenia viral



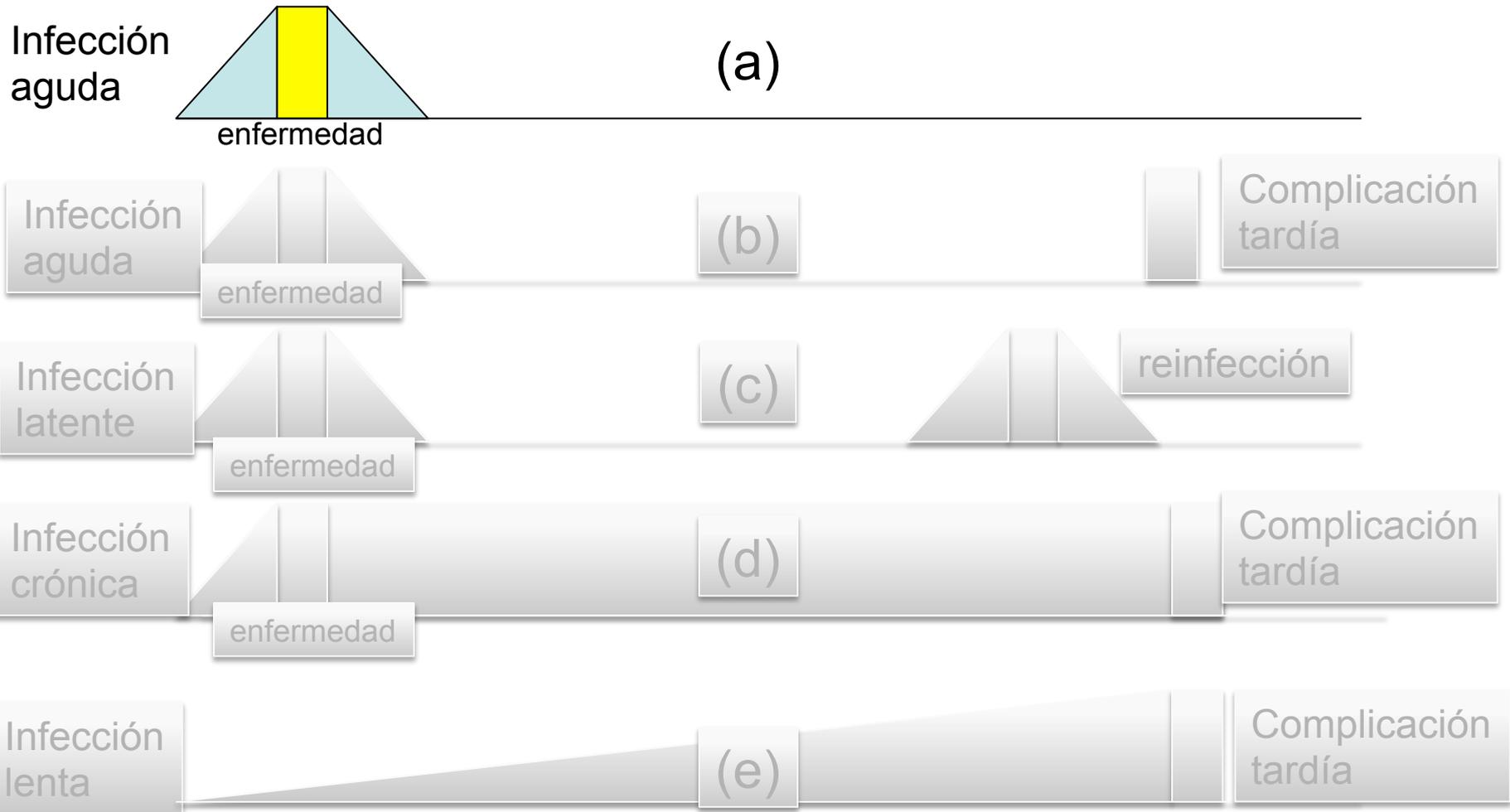
Infección viral

1. Aguda
2. Crónica (infección persistente)



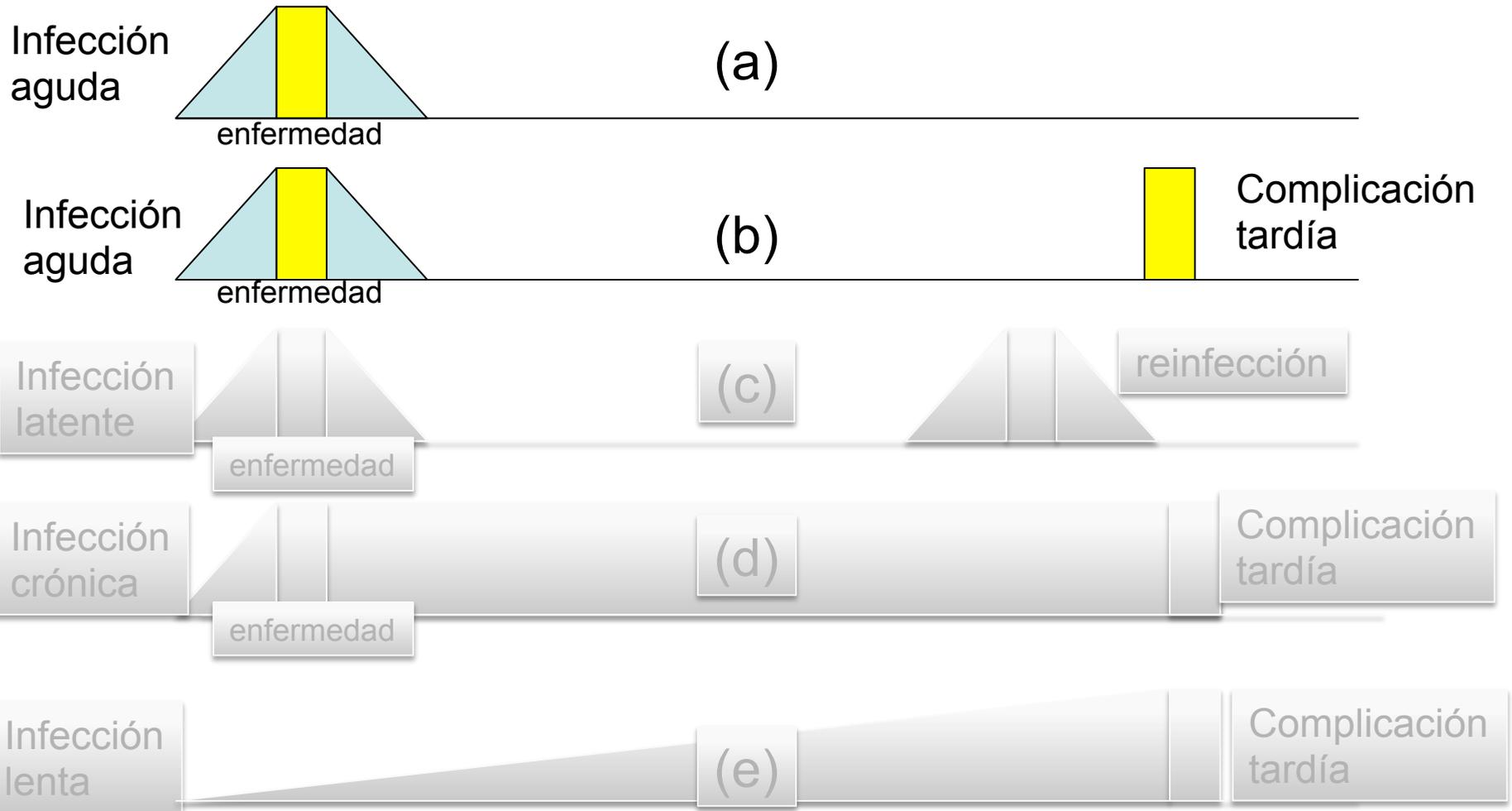
Infección viral

1. Aguda
2. Crónica (infección persistente)



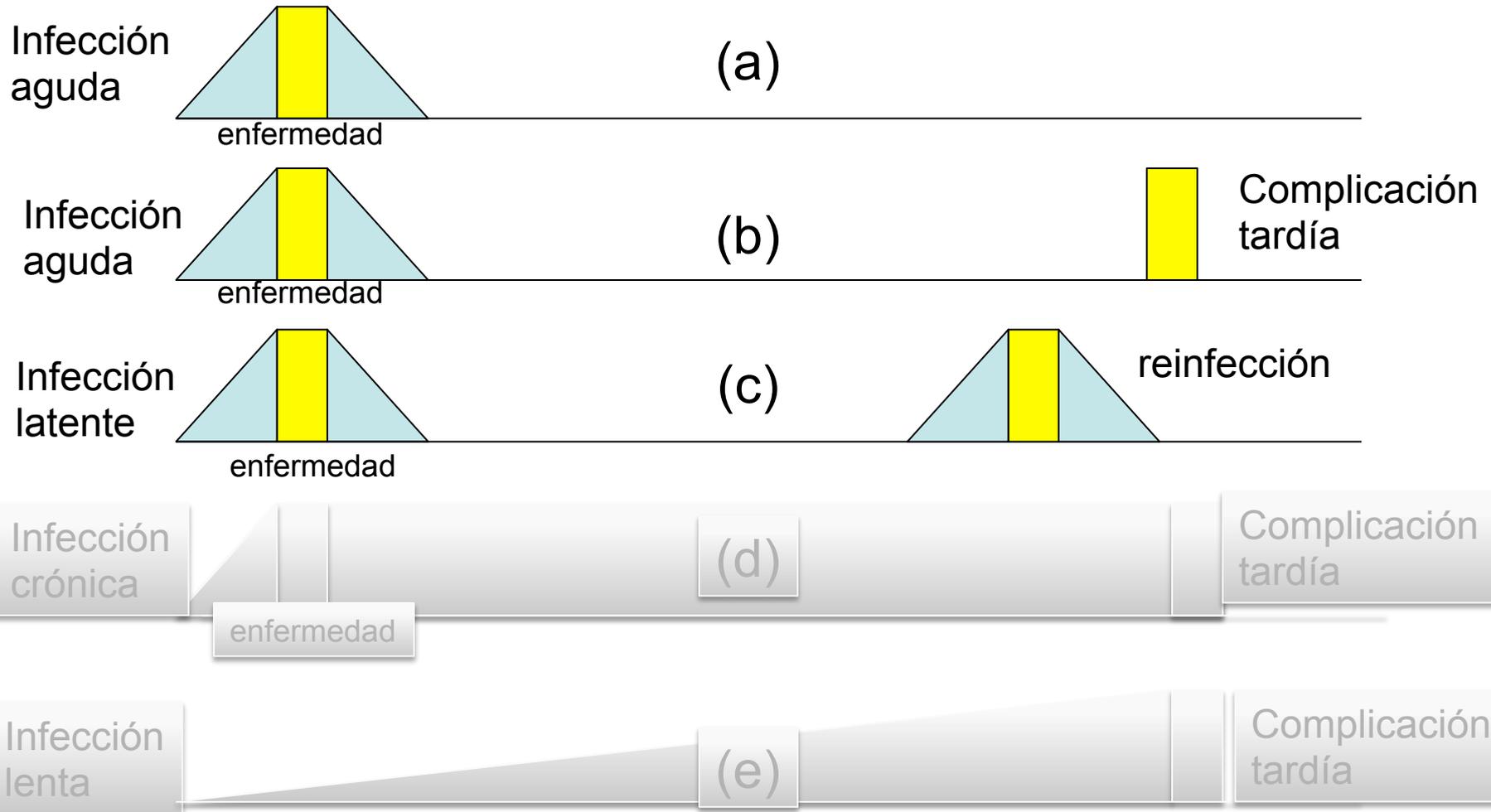
Infección viral

1. Aguda
2. Crónica (infección persistente)



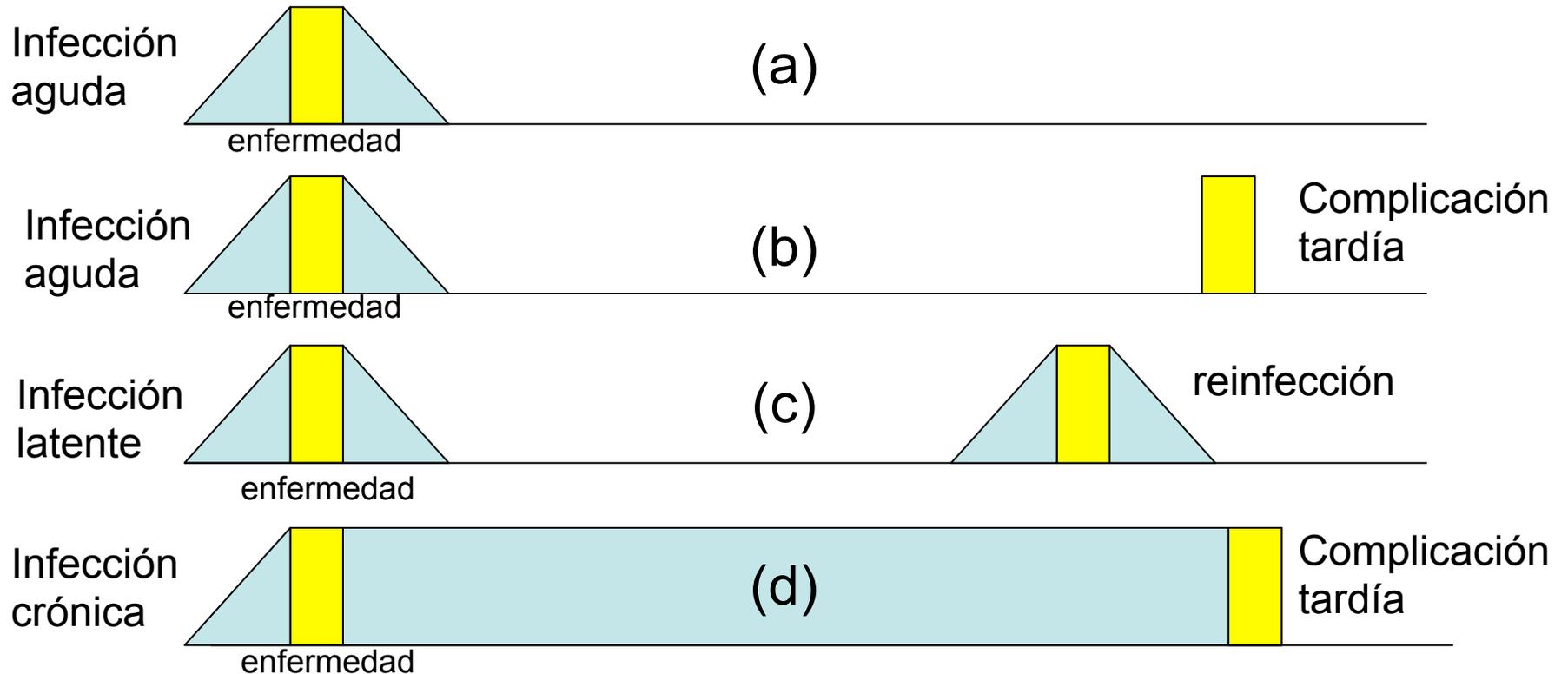
Infección viral

1. Aguda
2. Crónica (infección persistente)



Infección viral

1. Aguda
2. Crónica (infección persistente)



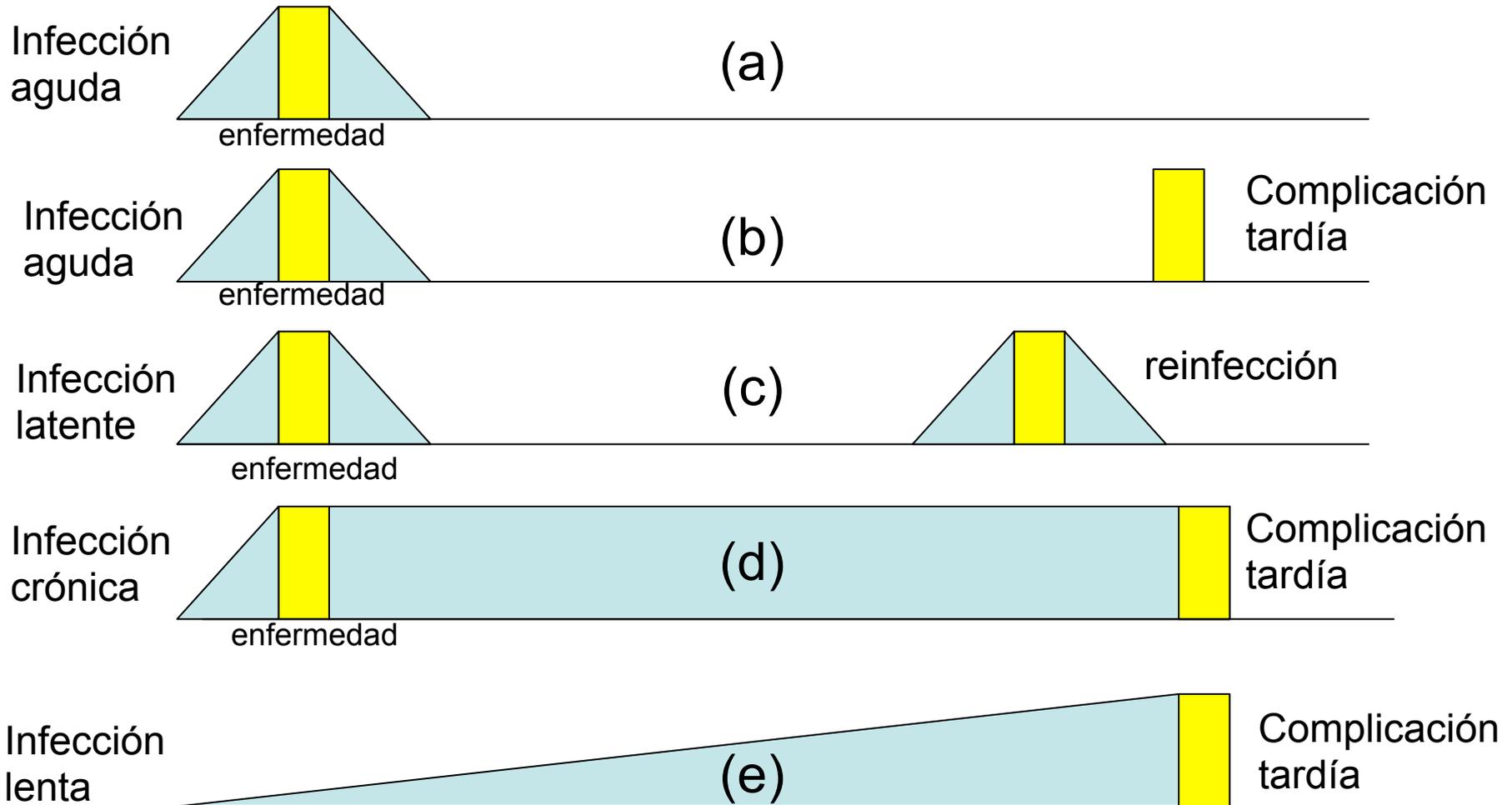
Infección
lenta

(e)

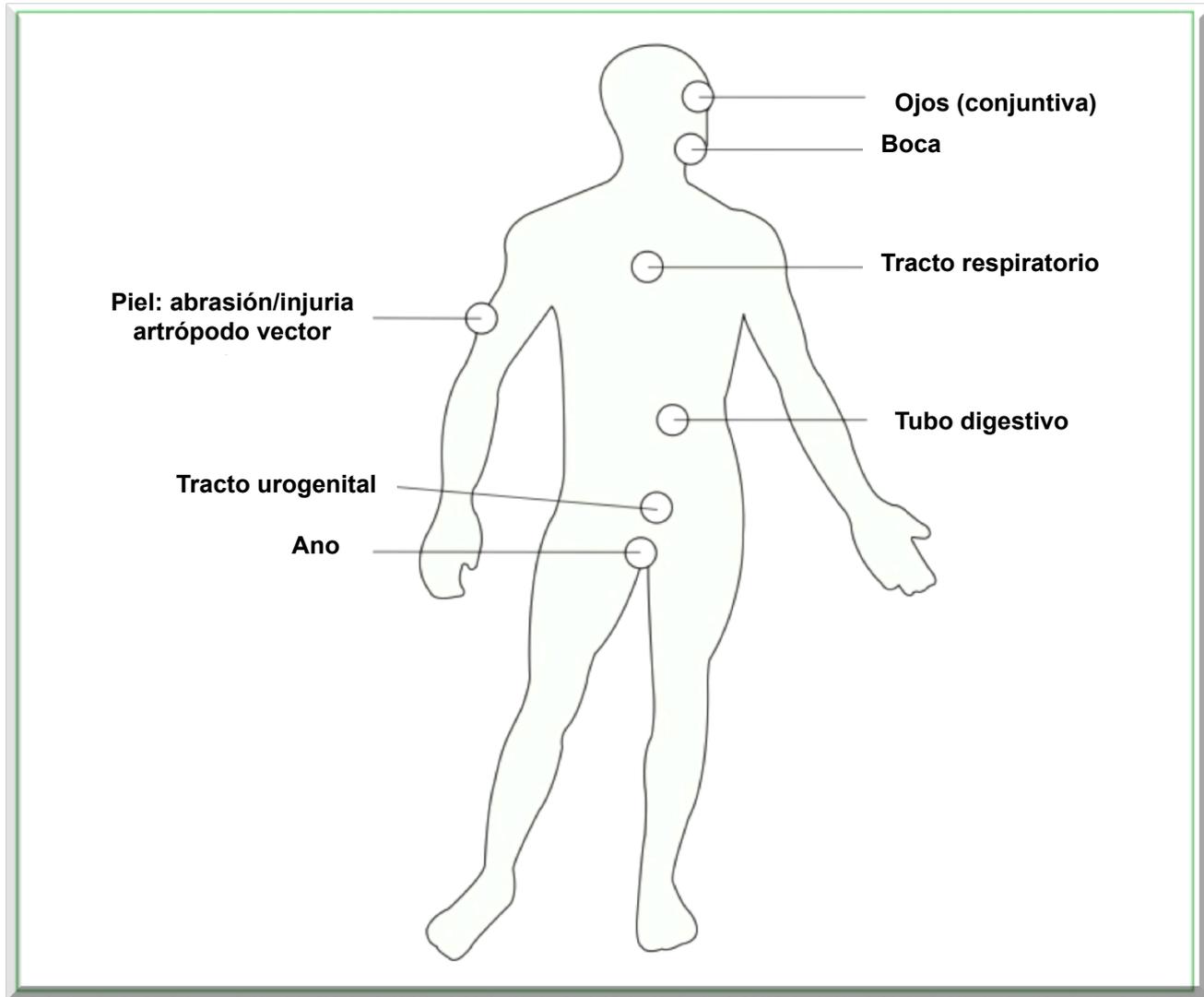
Complicación
tardía

Infección viral

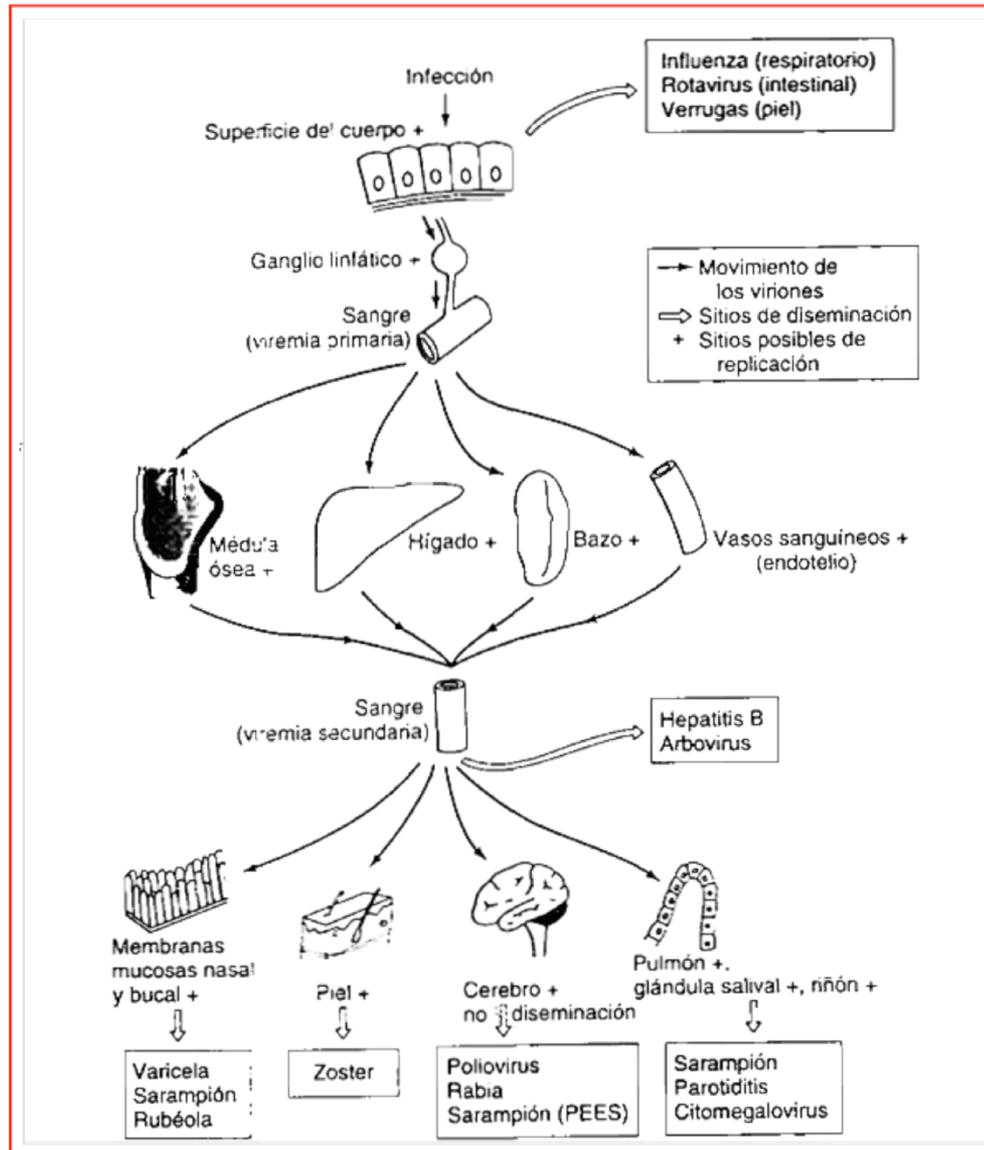
1. Aguda
2. Crónica (infección persistente)



Virus-vías de ingreso



Vías de diseminación



virus



Embarazada susceptible

Aborto espontáneo

Feto normal

Infección materna

Infección amniótica

huevo

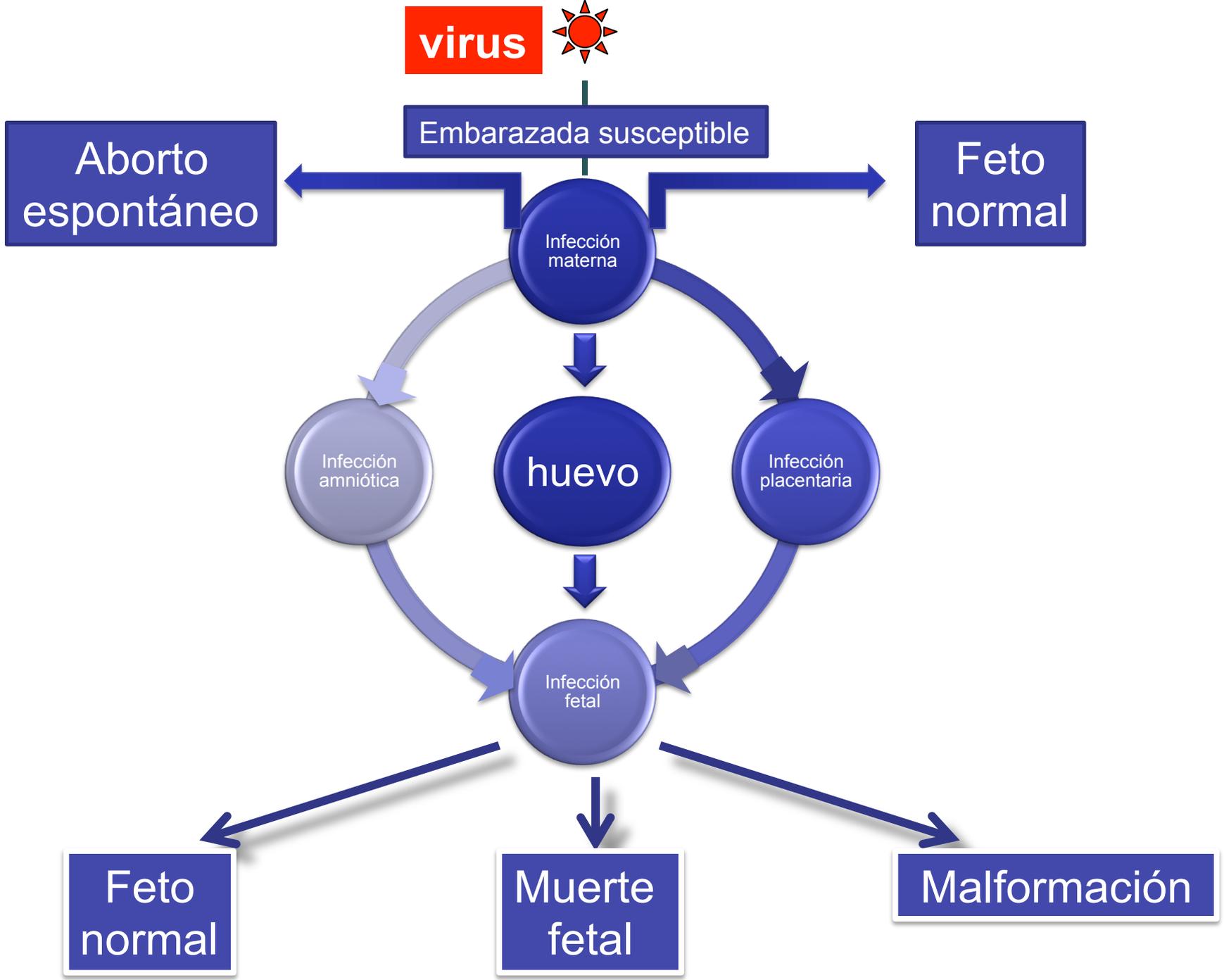
Infección placentaria

Infección fetal

Feto normal

Muerte fetal

Malformación



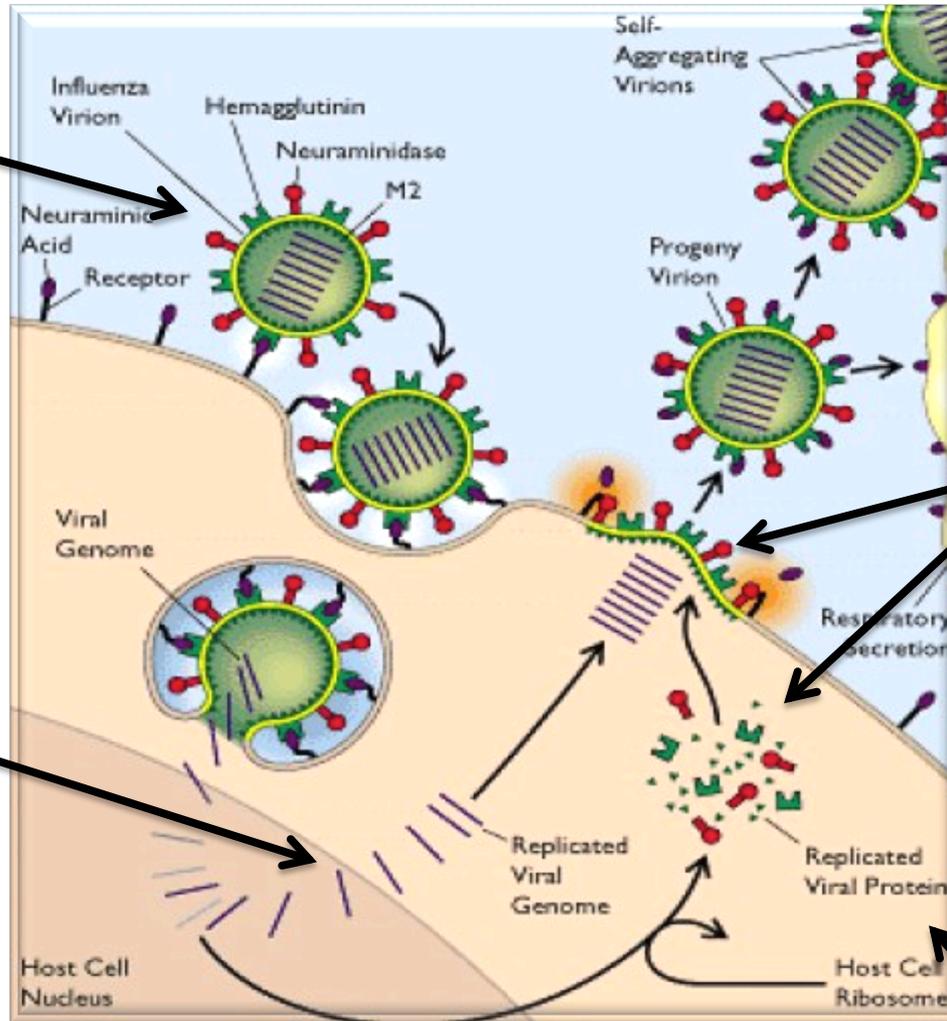
Diagnóstico virológico

Métodos de diagnóstico

- *Métodos directos*
- *Métodos indirectos*

Métodos directos

- Virión
- Partícula viral

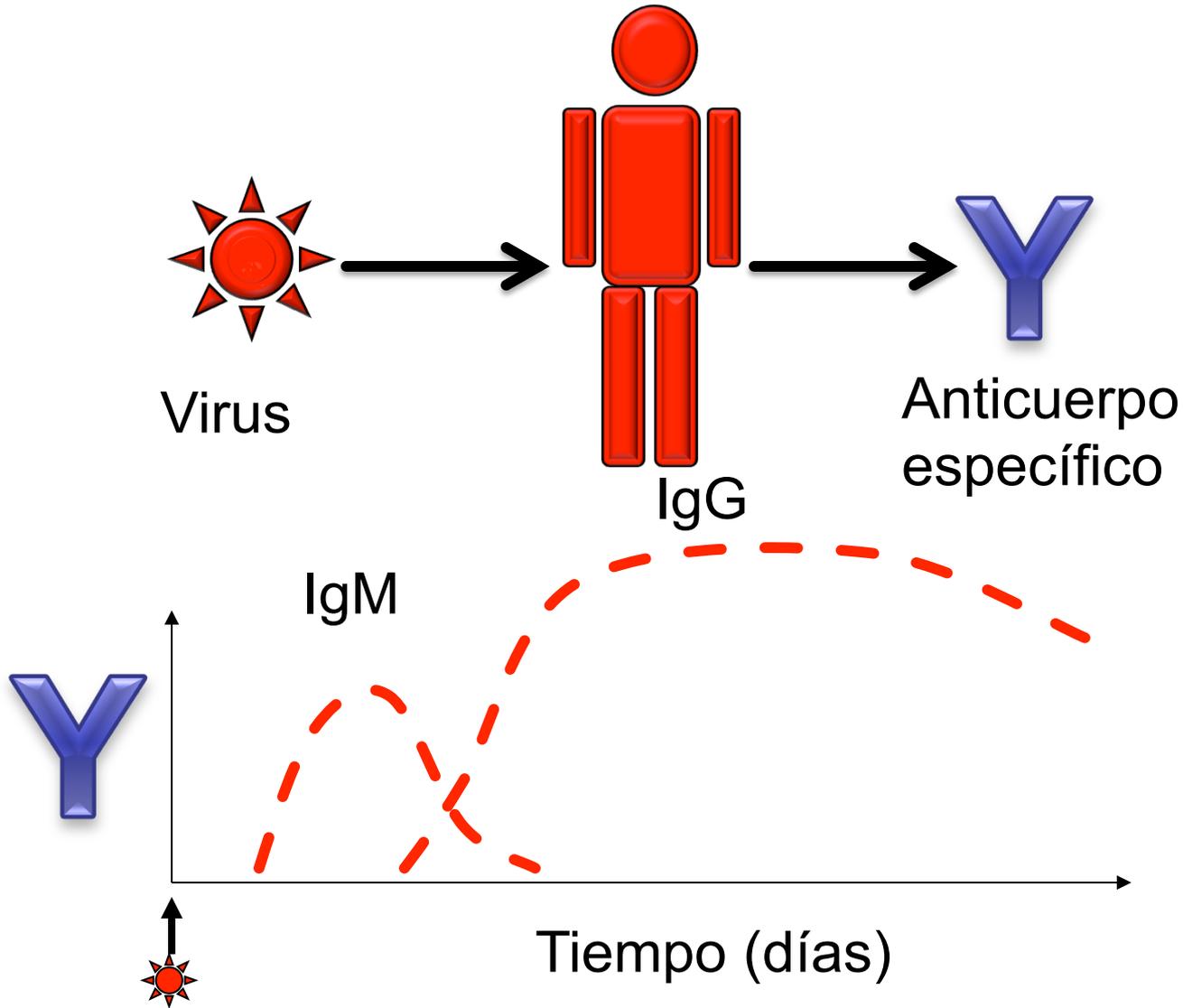


Genoma viral

Proteínas virales

Células infectadas

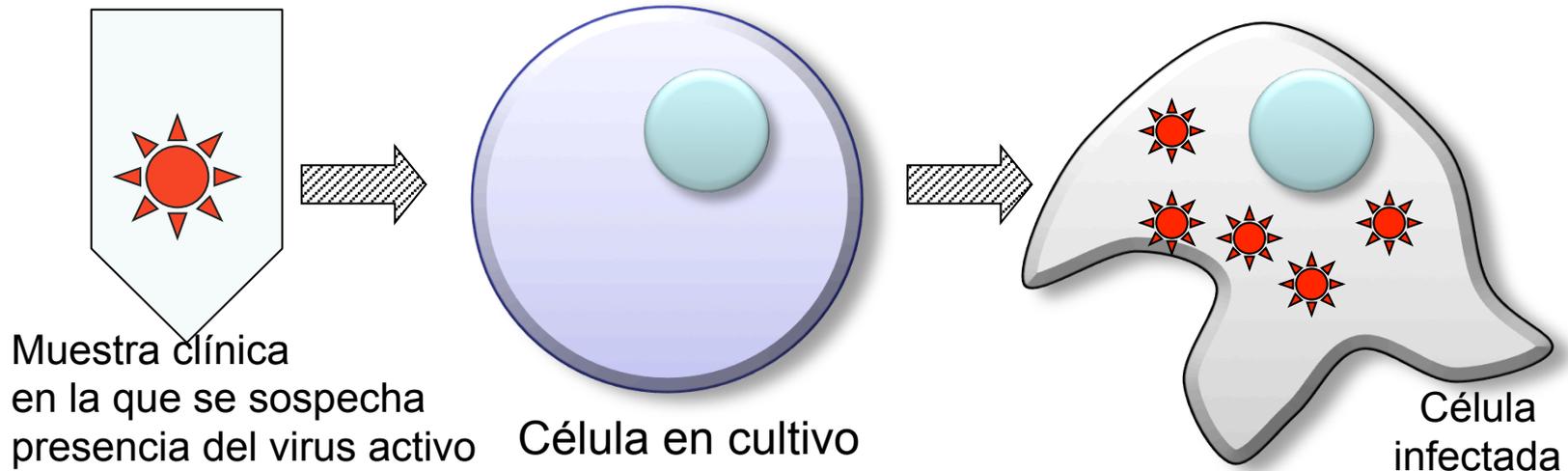
Métodos indirectos



Métodos directos

Aislamiento viral

Objetivo: detección de viriones activos en muestras de pacientes



La búsqueda de viriones se realiza infectando células cultivadas *in vitro*, también denominadas líneas celulares. La presencia de virus se determina viendo el efecto citopático del virus sobre la célula

Métodos directos

Efecto citopático

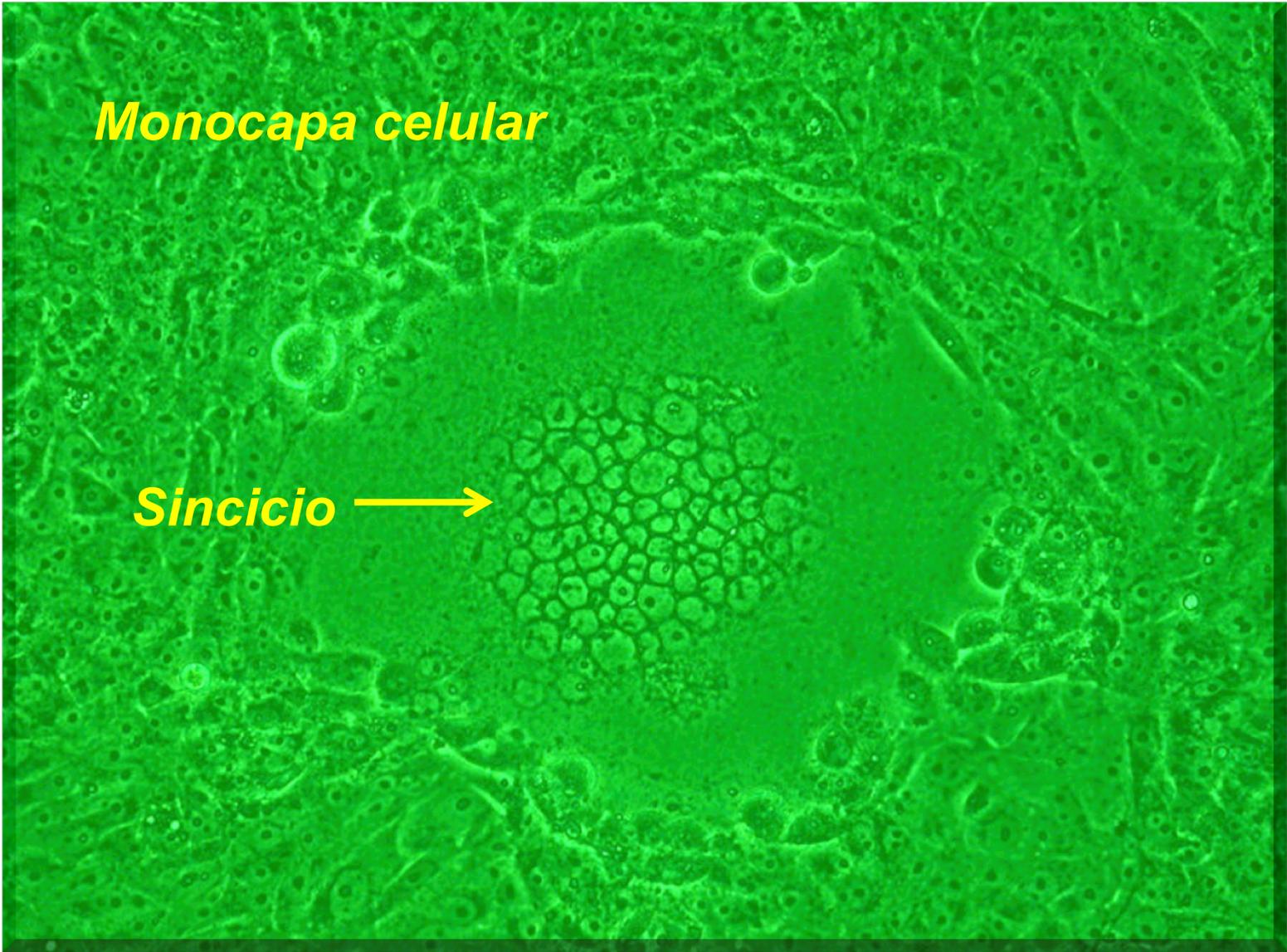
Se denomina efecto citopático a los cambios bioquímicos, morfológicos y/o de viabilidad celular, visualizables por microscopía óptica, y que se atribuyen a una replicación viral.

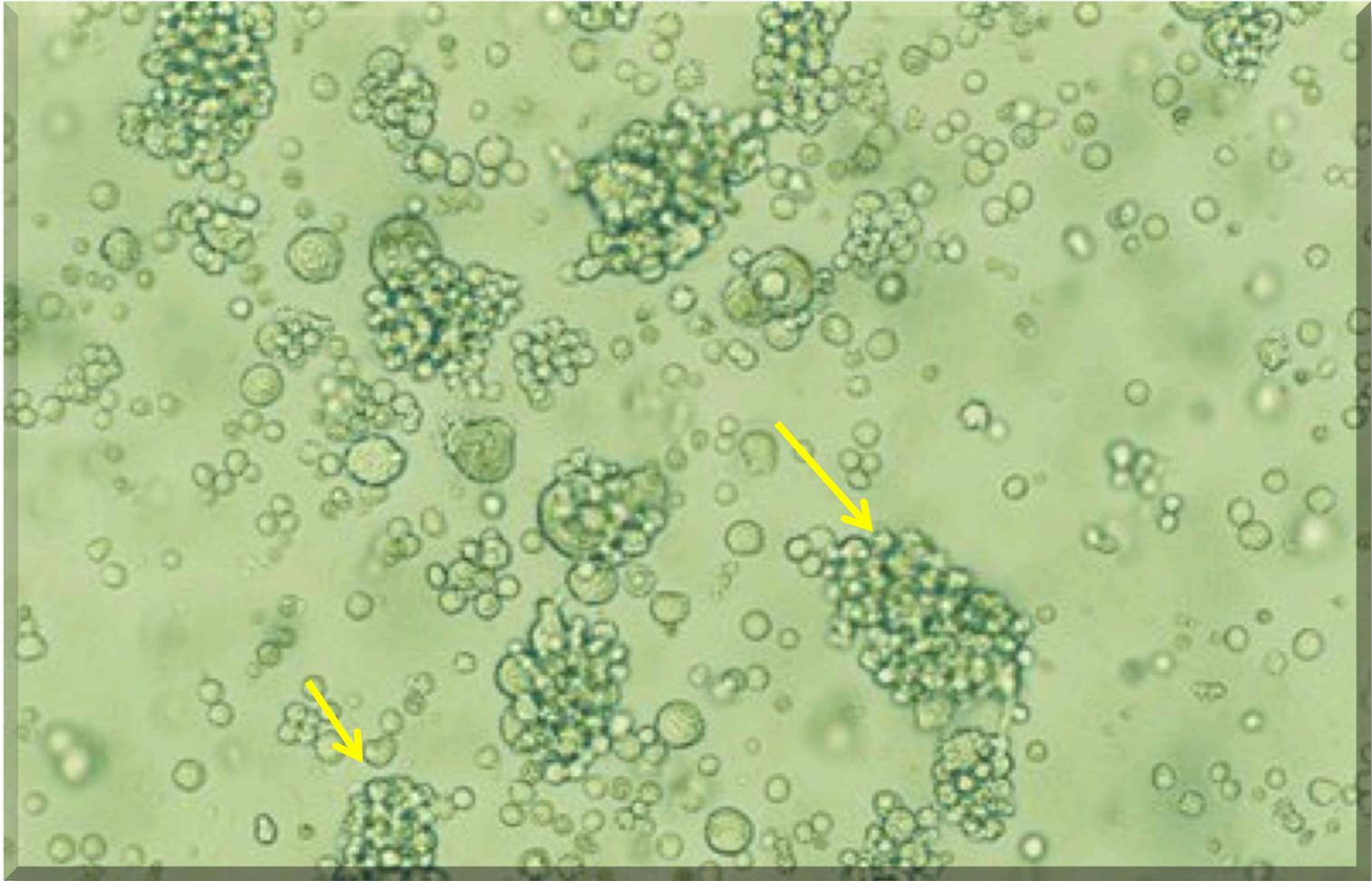
Los efectos citopáticos posibles son:

- Pérdida de adherencia celular al sustrato
- Redondeamiento celular
- Formación de sincicios o células multinucleadas
- Formación de cuerpos de inclusión citosólico o nuclear
- Transformación celular
- Lisis celular, etc.

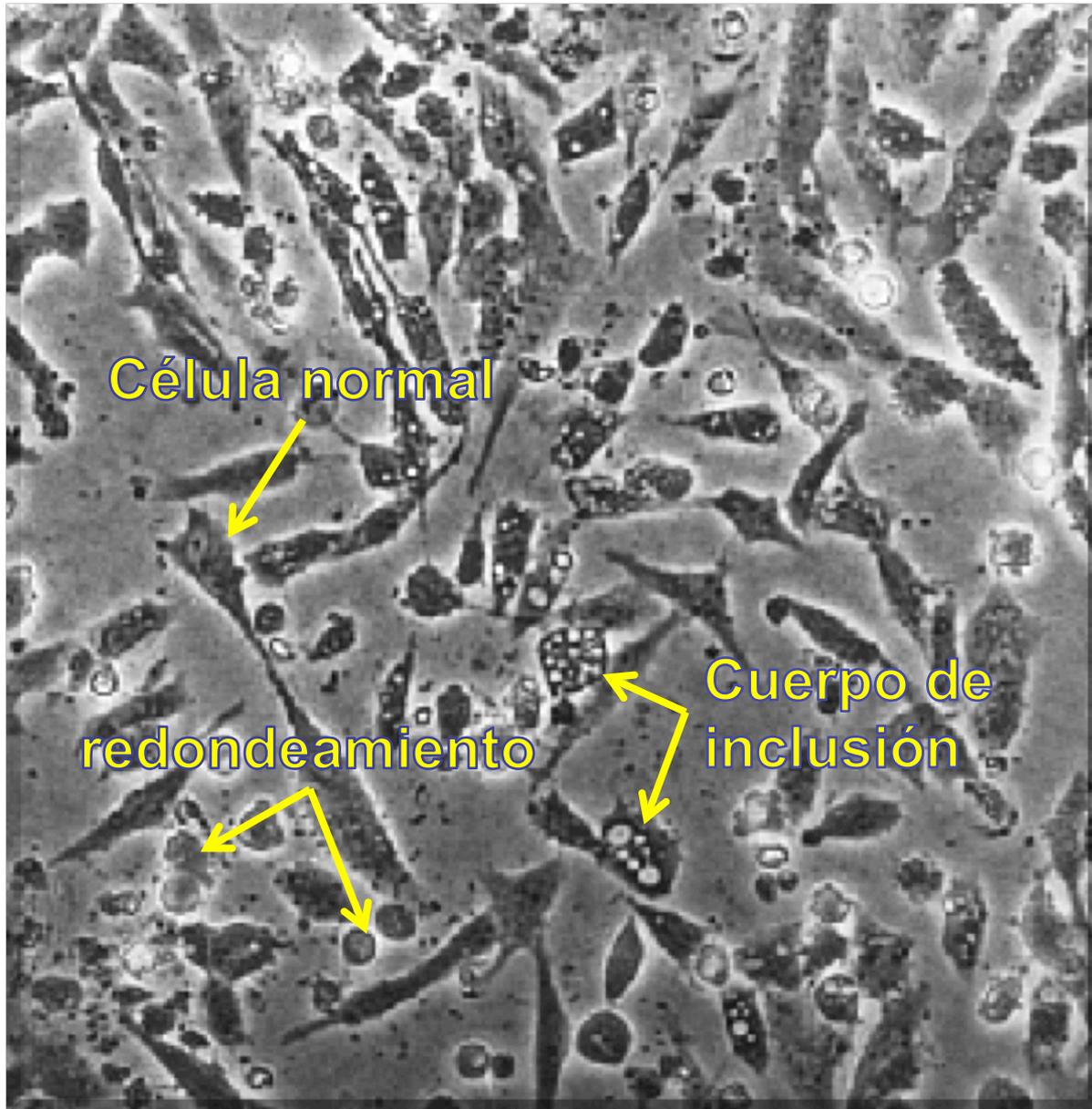
Monocapa celular

Sincicio →





Redondeamiento y pérdida de adherencia al sustrato



Célula normal

redondeamiento

Cuerpo de inclusión

Métodos directos

Interpretación de resultados

Positivo

- Presencia de un virión compatible con la manifestación clínica evidenciada

Distintos virus pueden dar idéntico efecto citopático, se recomienda entonces una confirmación empleando antisueros neutralizantes de referencia.

Negativo

- Ausencia del virión
- Imposibilidad técnica para el aislamiento viral.
 - Error en la extracción de muestra
 - Almacenamiento erróneo de la muestra

Métodos directos

Búsqueda de Partícula Viral

Visualizable por Microscopía Electrónica

- Corte histológico ultrafino

muestras de tejidos. Se buscan en el citoplasma celular

- Tinción negativa

Suspensión viral teñida y visualizada en el ME.

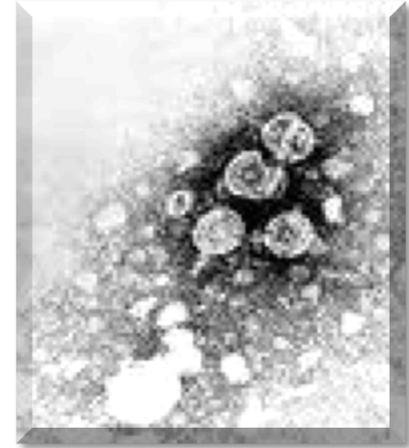
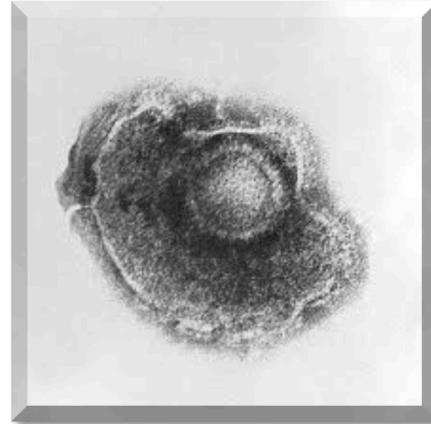
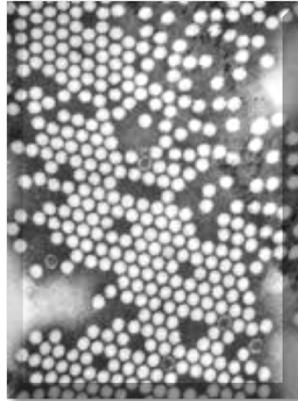
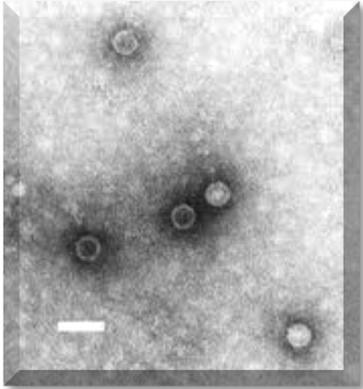
Se requieren altas concentraciones de partículas virales, esto solo es posible dentro de las 48 hs de iniciada la infección

Interpretación de resultado

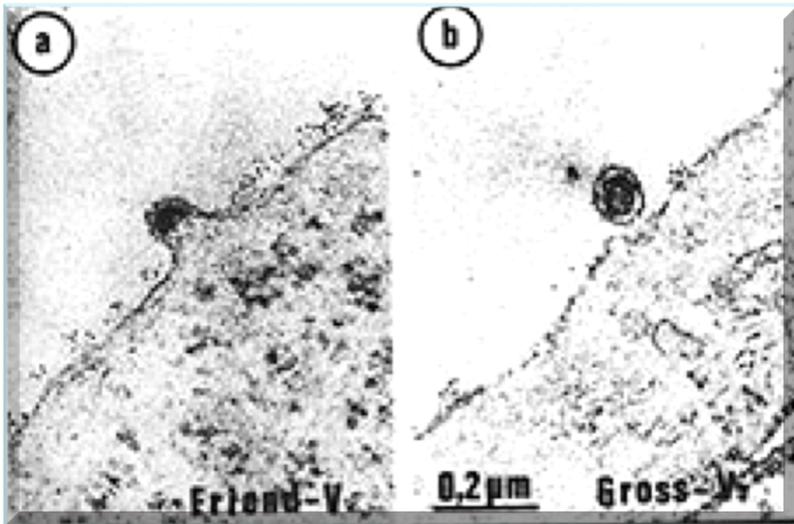
Positivo: Confirma la presencia de viriones en distintos estadios del ciclo replicativo o bien partículas virales con estructura compatible con la esperada.

Métodos directos

Tinción negativa



Corte ultrafino



Métodos directos

Detección de proteínas virales

Requieren de anticuerpos (Policlonales o Monoclonales) específicos, empleados como reactivos analíticos, que reconozcan “específicamente” la/las proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales.

Métodos

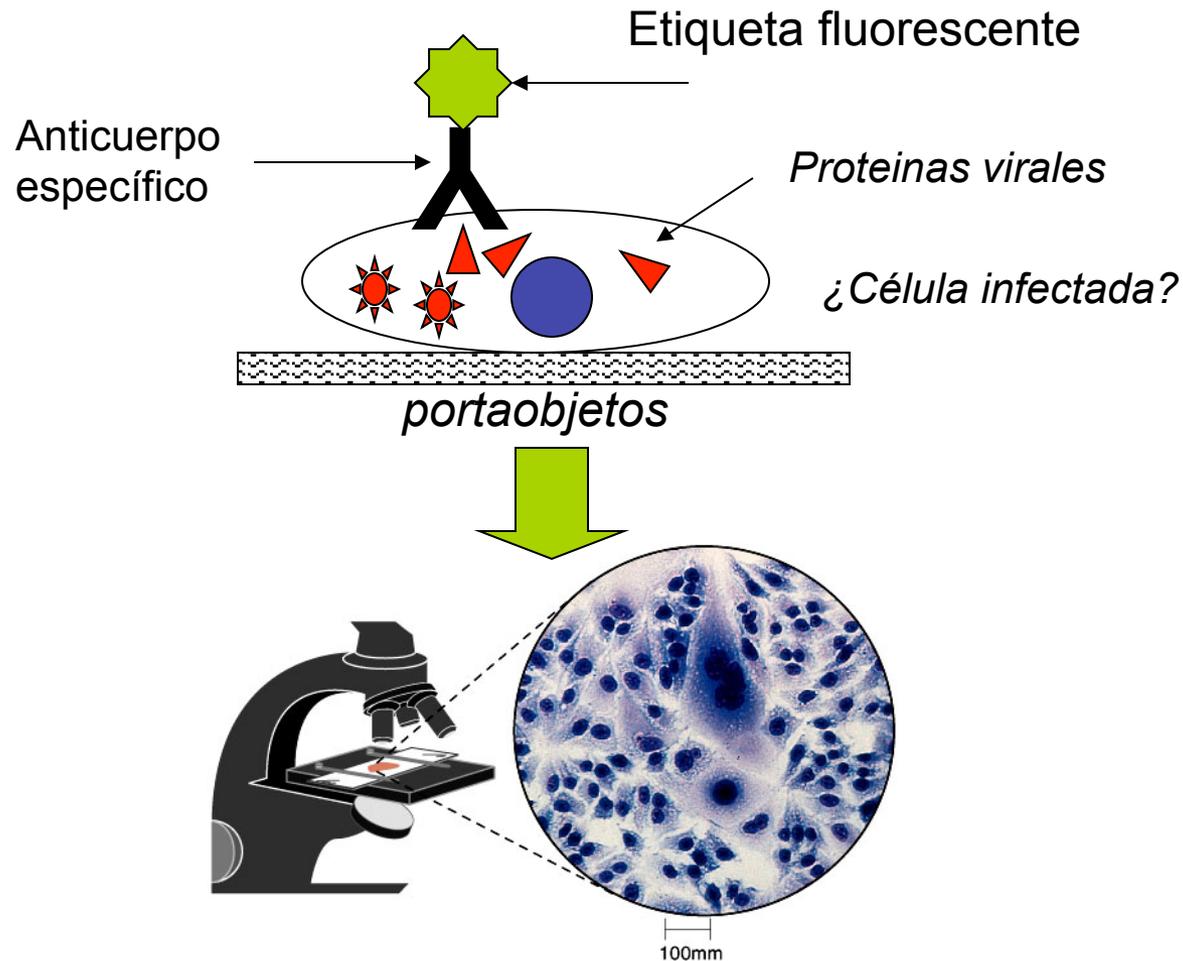


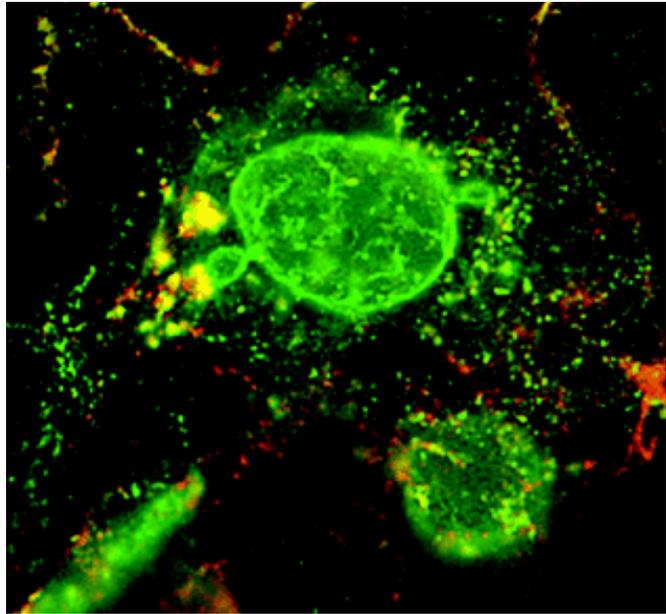
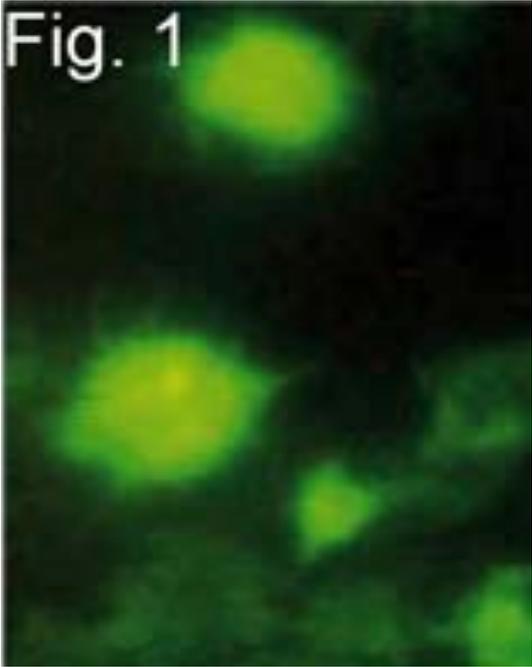
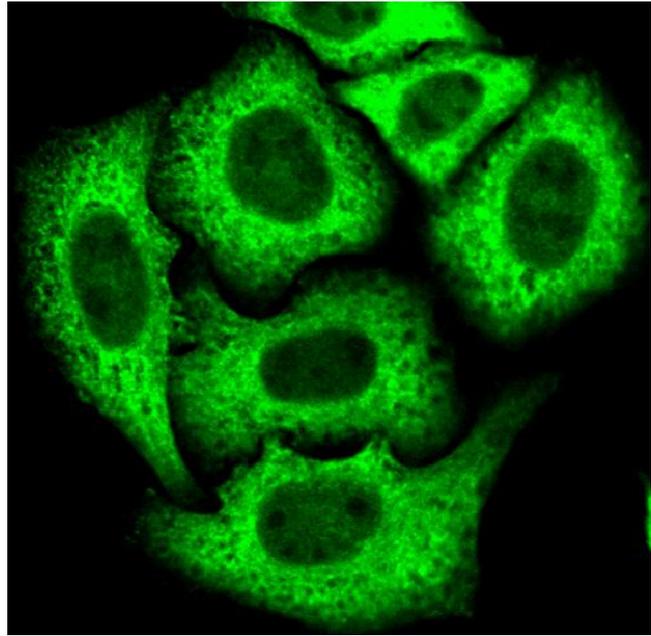
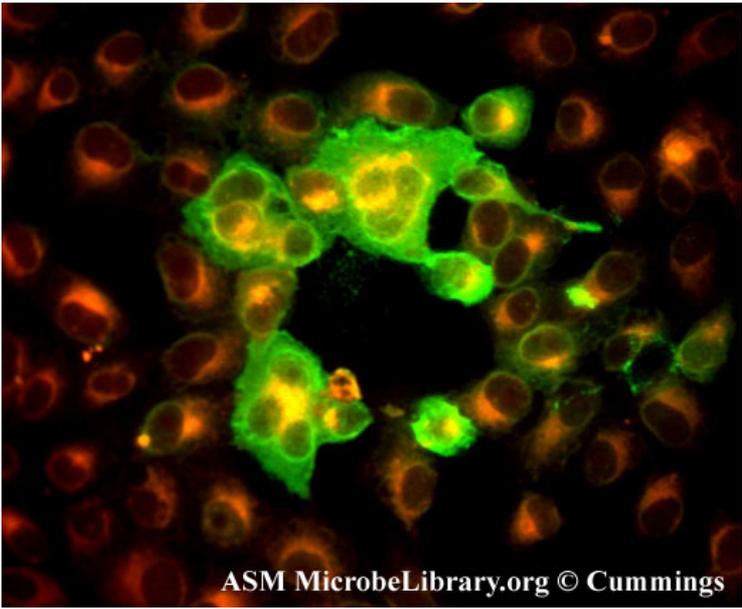
- Inmunofluorescencia
- Enzimoimmunoanálisis
- Fluoroimmunoanálisis
- Radioimmunoanálisis
- Western-blot

Métodos directos

Inmunofluorescencia directa

Detección de proteínas virales en células obtenidas de tejidos con sospecha de infección viral.





Métodos directos

Interpretación de resultado

La presencia de células con fluorescencia específica, indica infección viral productiva.

El uso de un anticuerpo permite la identificación del virus involucrado.

Útil como test confirmatorio del efecto citopático.

Métodos directos

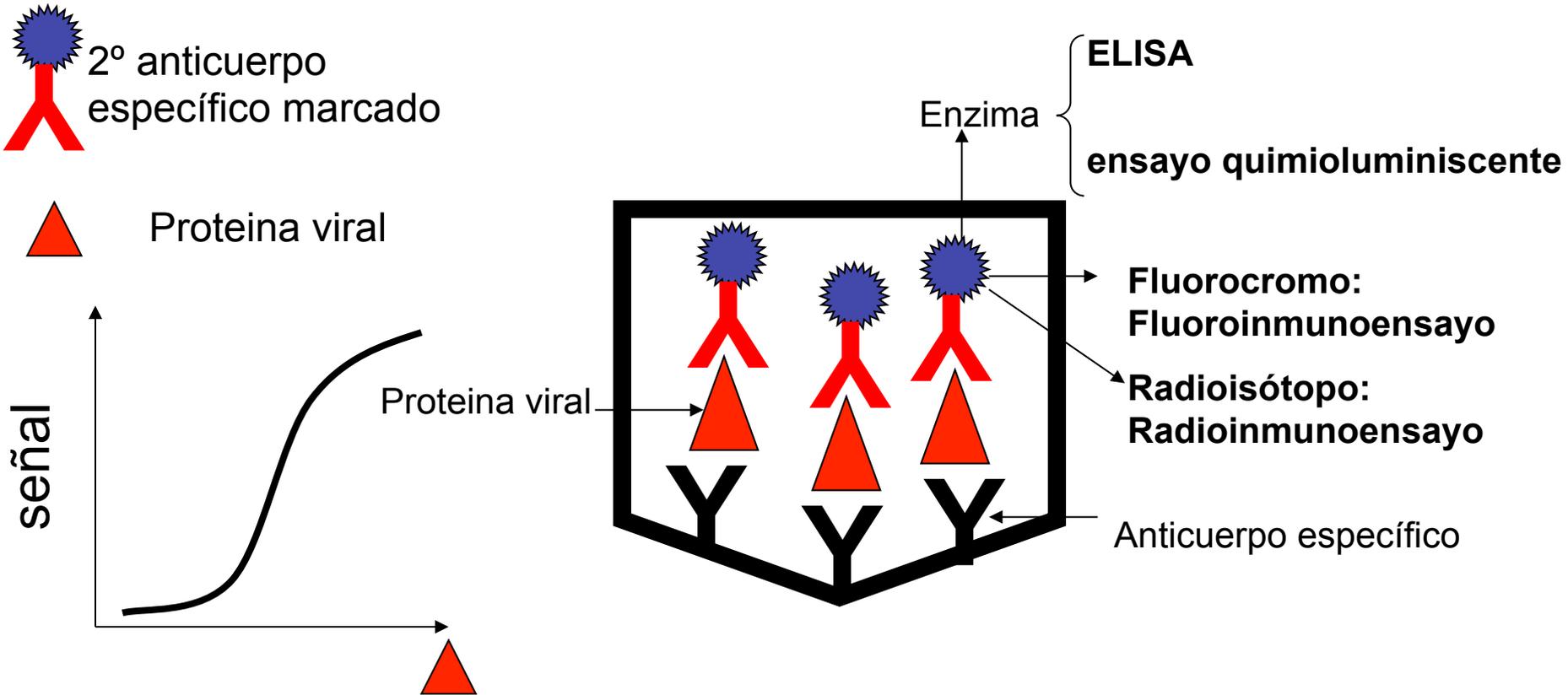
Efecto citopático (+)

**Inmunofluorescencia
con anticuerpo
específico (+)**

CONFIRMATORIO

Métodos directos

Inmunoanálisis en Fase Sólida

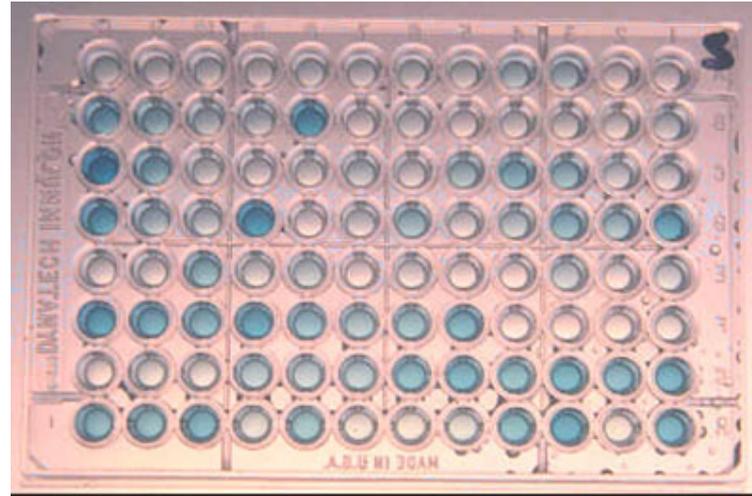


Interpretación del resultado

Un cambio significativo en la señal del ensayo es considerado resultado POSITIVO e indica presencia de proteína viral en la muestra clínica procesada.

Un resultado negativo puede indicar ausencia de proteína Viral o bien una incorrecta obtención de la muestra.

Métodos directos



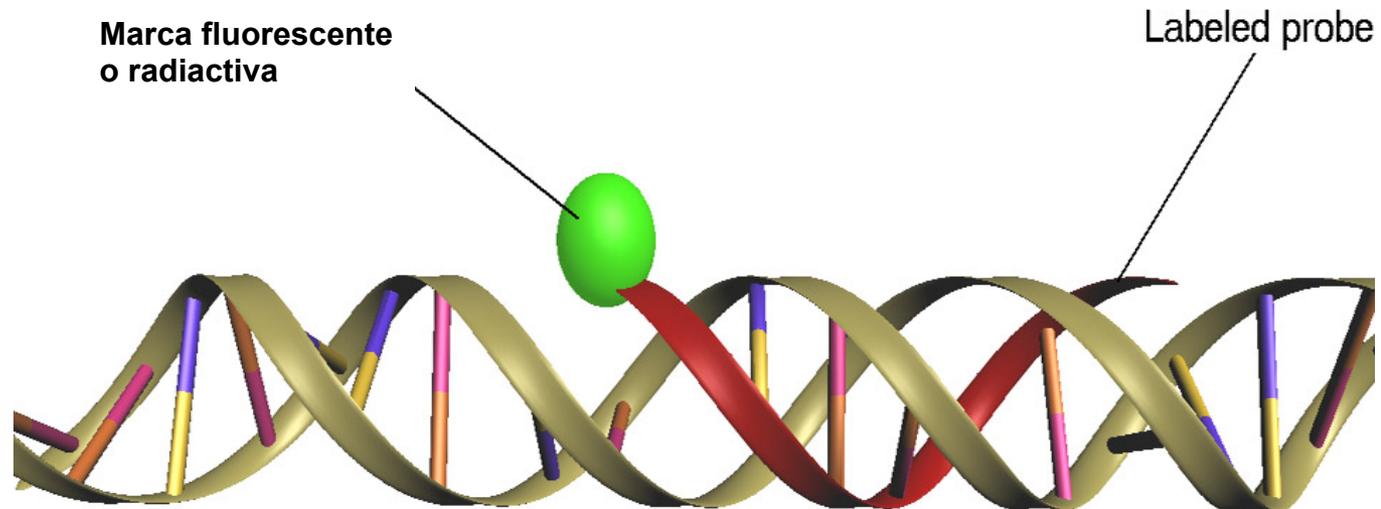
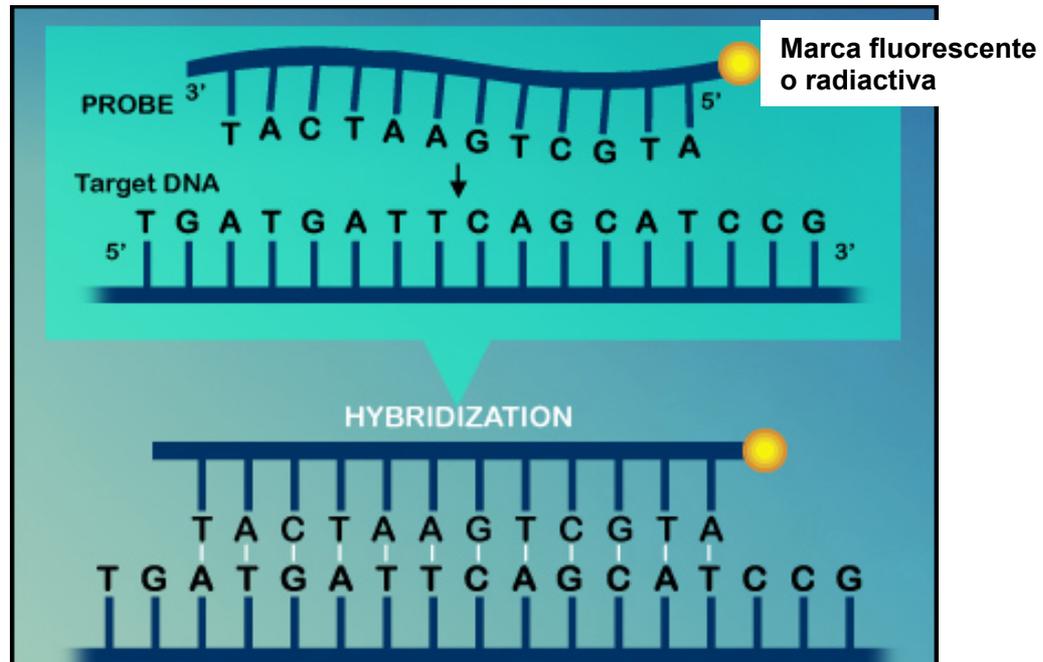
Métodos directos

Detección de genoma Viral

Útil para establecer genotipos virales que en algunos casos pueden ser de alto riesgo.

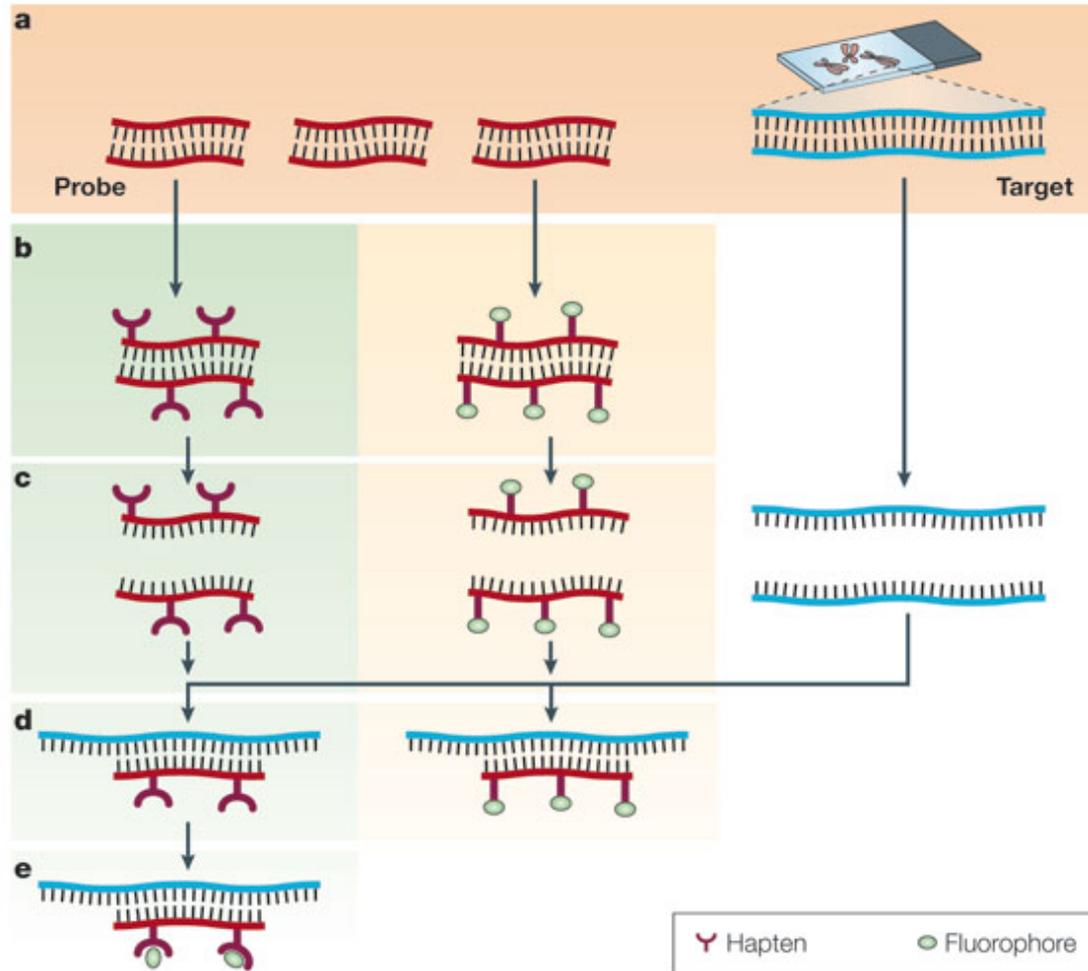
Métodos

- Hibridación *in situ*
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

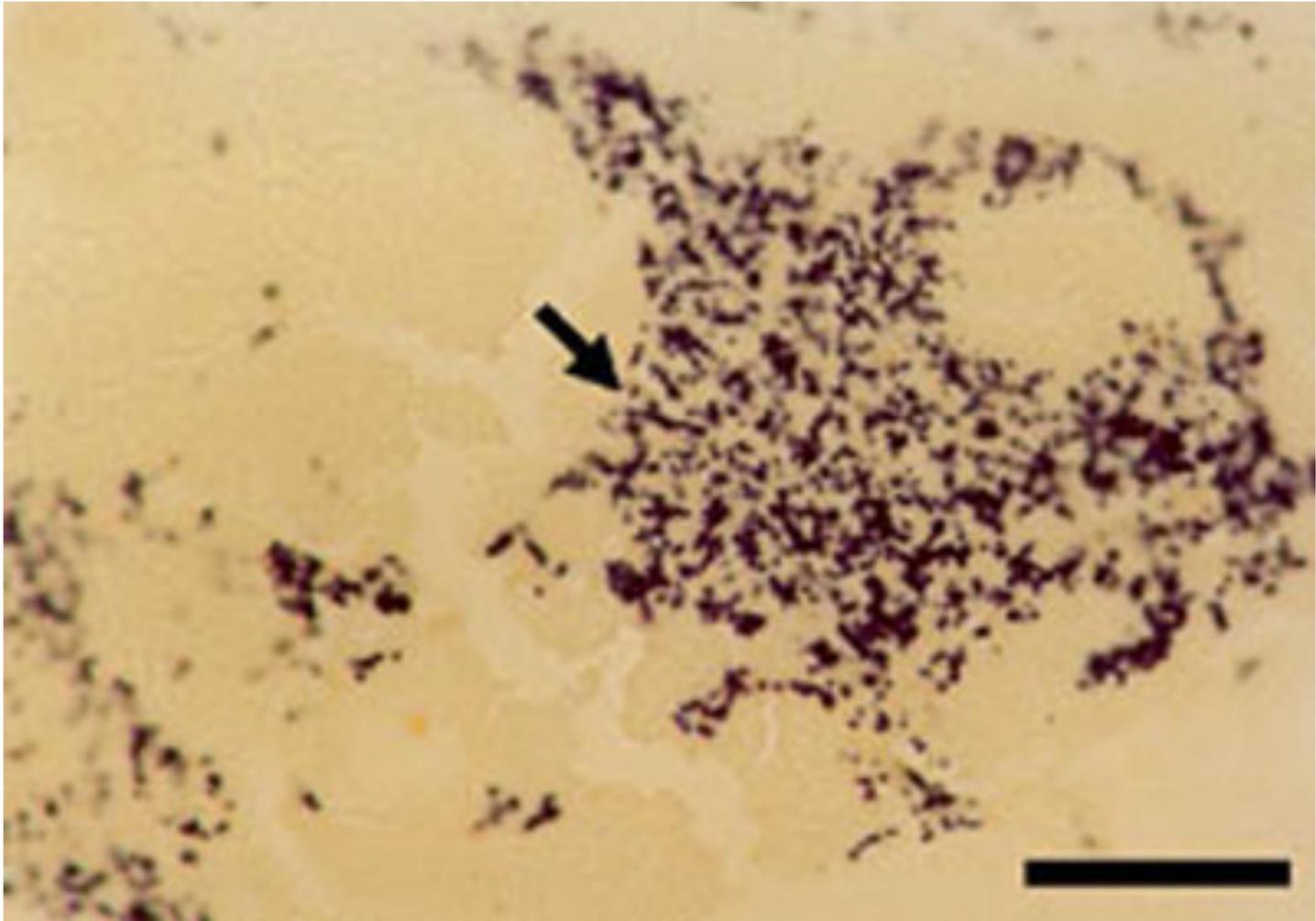


Métodos directos

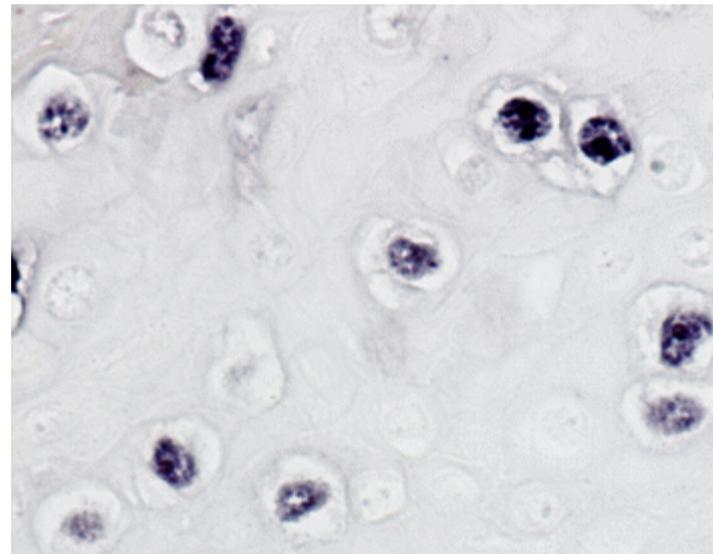
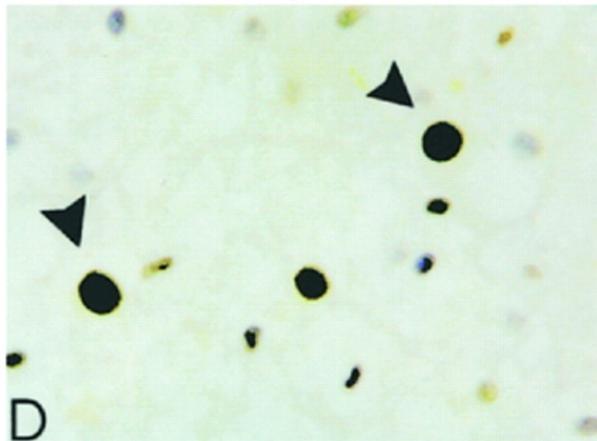
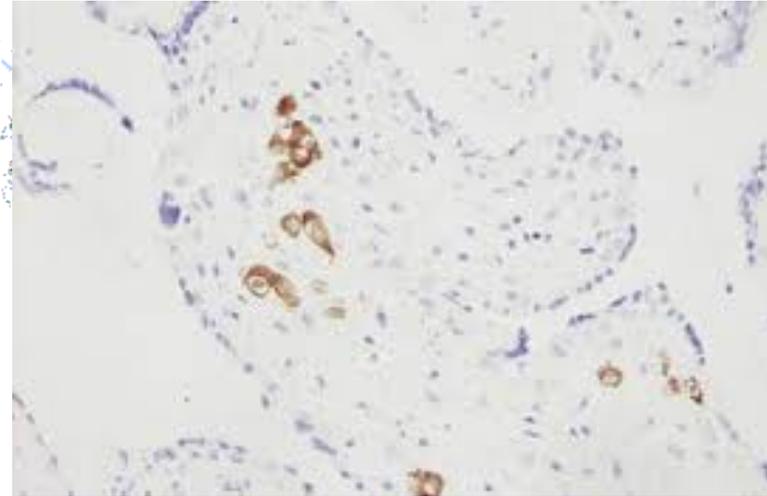
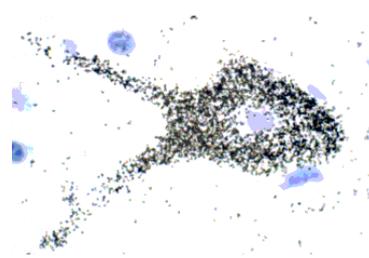
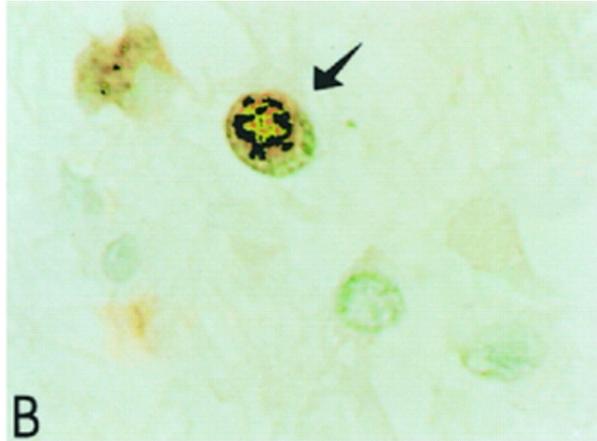
Hibridación *in situ*



Métodos directos



Métodos directos



Métodos directos

Interpretación

Confirmatorio de infección viral

Permite determinar genotipos virales.

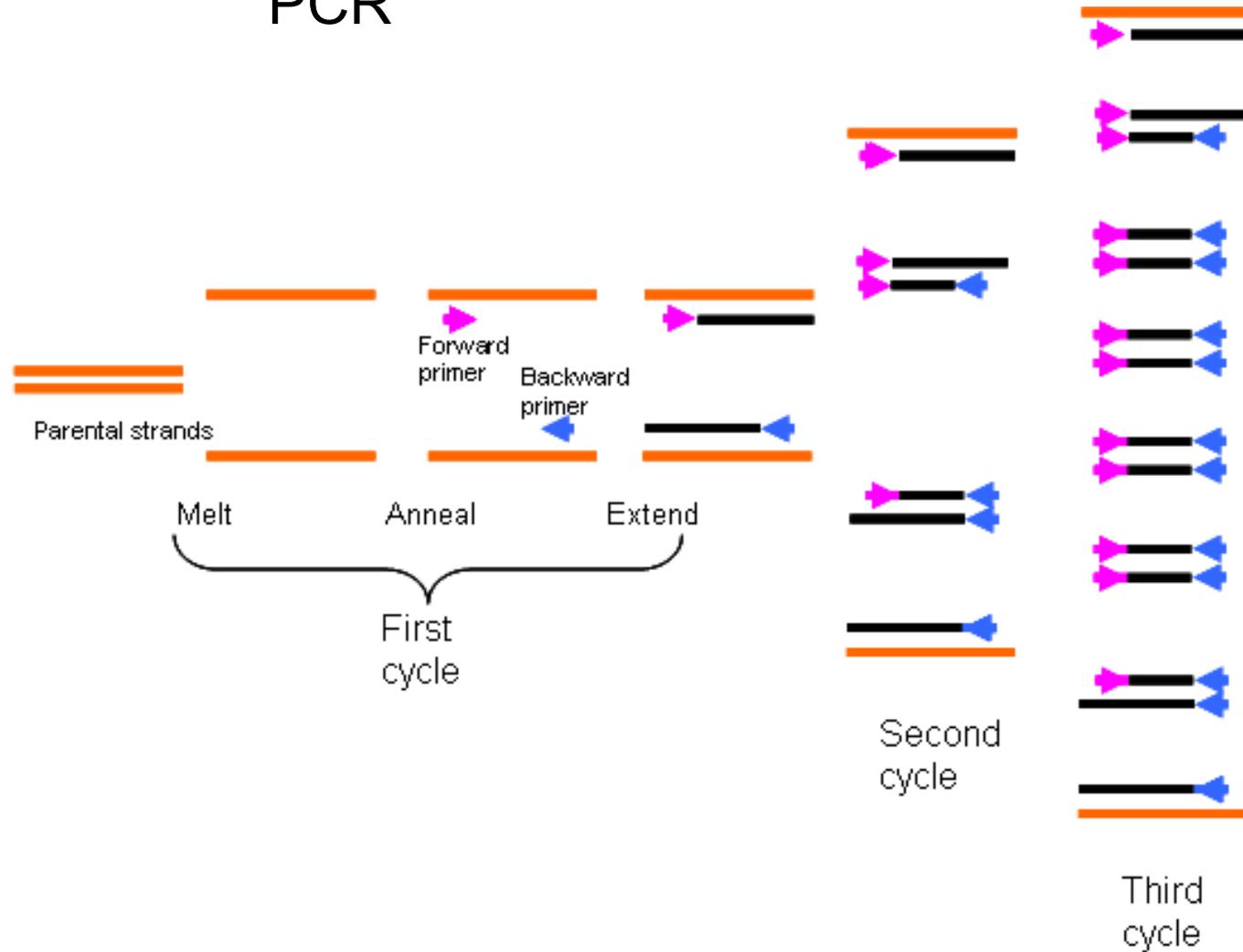
En algunos casos (Papiloma Virus) el genotipo viral permite determinar riesgo de progreso a tumor.

En virus con fase de integración permite la detección del provirus en el genoma de la célula huésped.

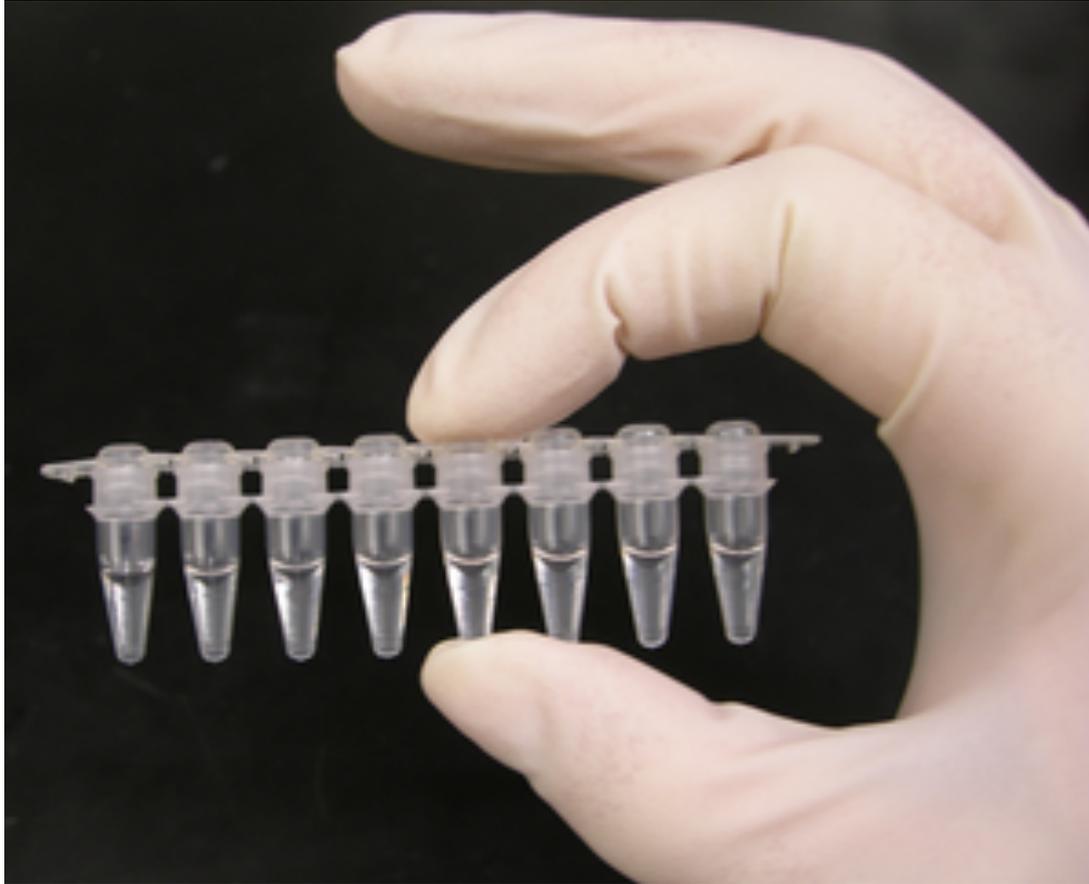
En virus con fase de latencia permite detectar el genoma viral en el núcleo de la célula infectada

Métodos directos

Reacción en cadena de la polimerasa PCR

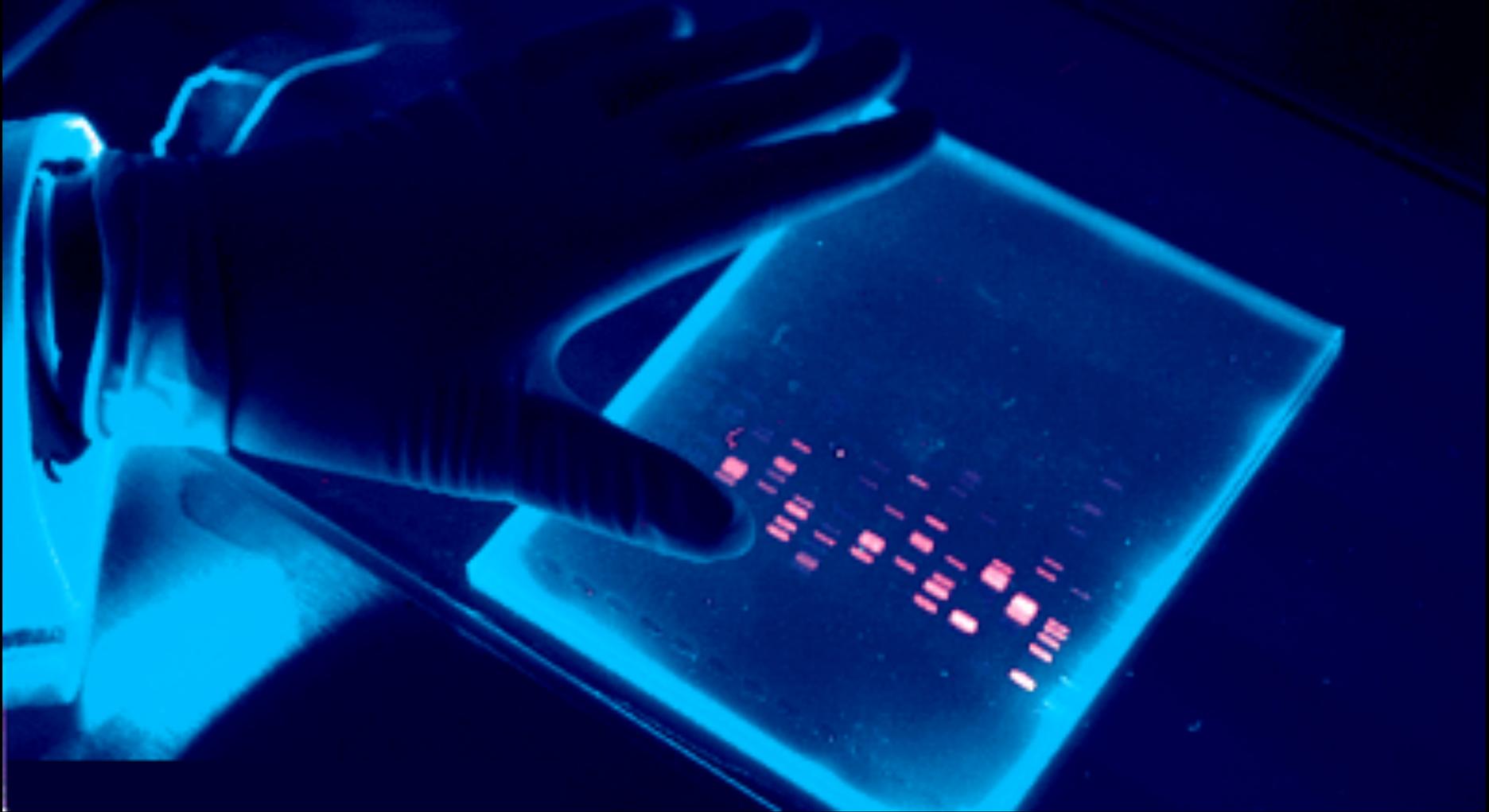


Métodos directos

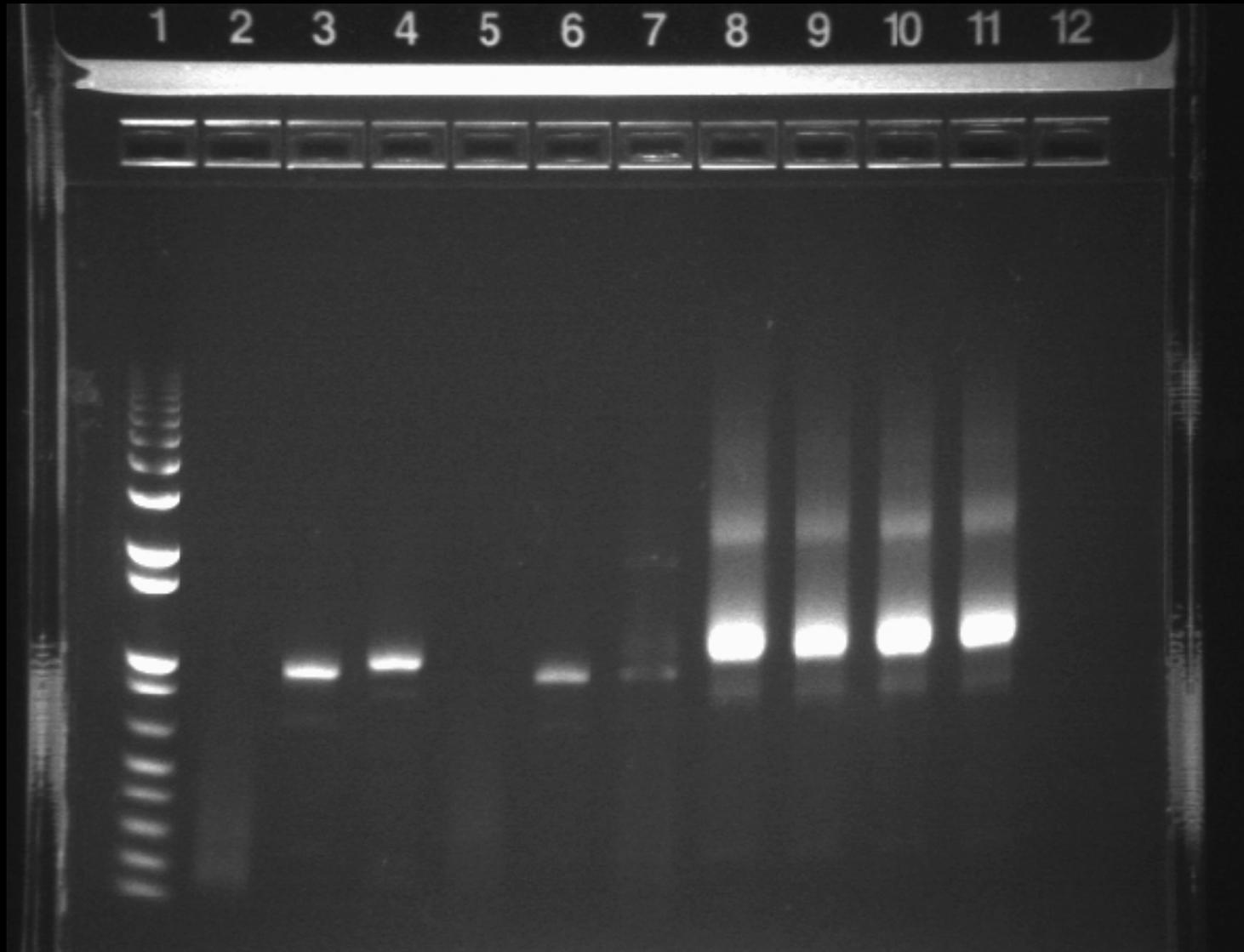


Termociclador

Métodos directos



Métodos directos



Métodos directos

Interpretación del resultado

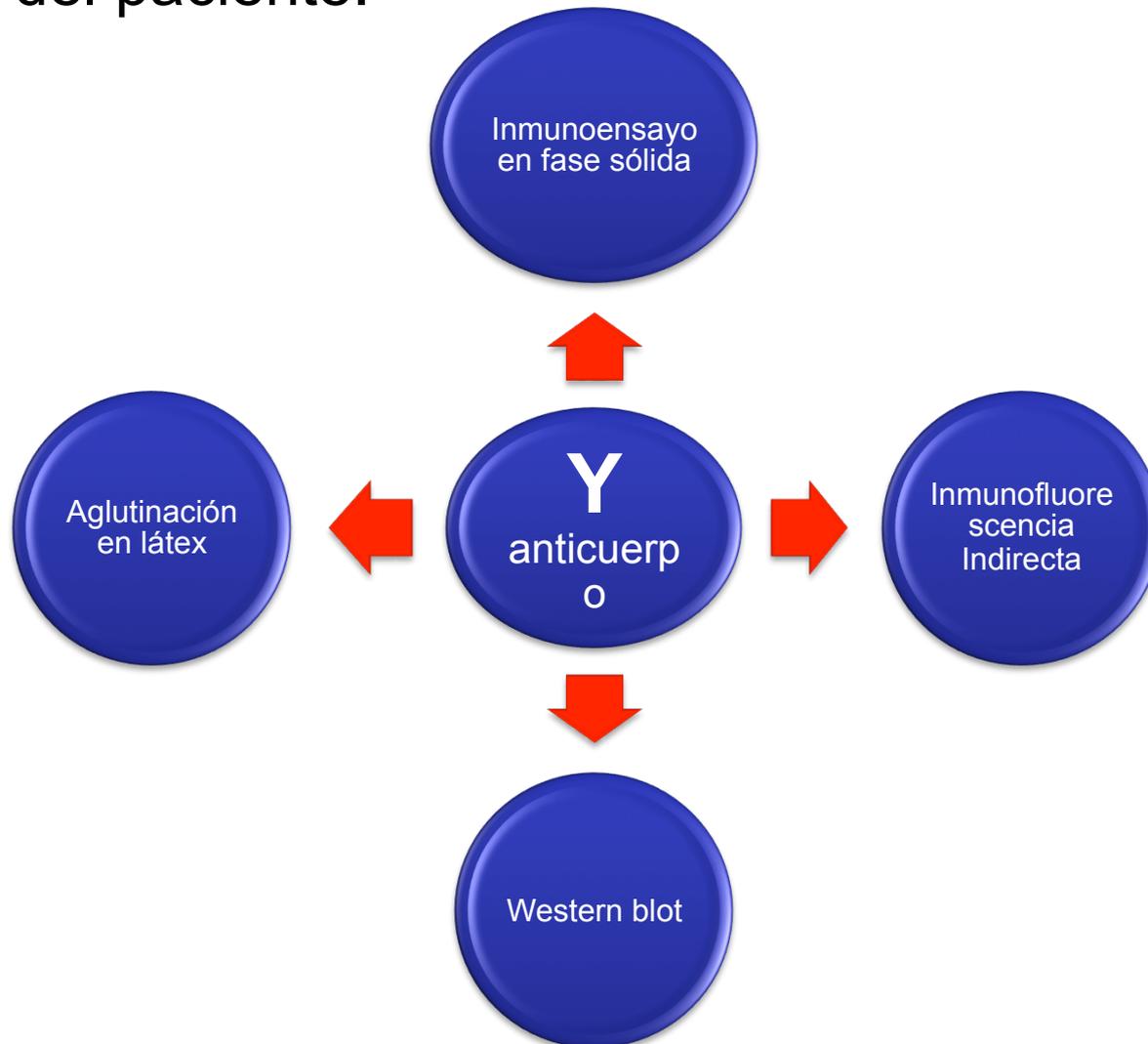
La presencia de una banda del tamaño esperado es diagnóstica de la presencia del genoma viral, indicando infección viral.

Tiene mayor sensibilidad de detección que la Hibridización *in situ*

Permite la genotipificación del virus involucrado en la infección

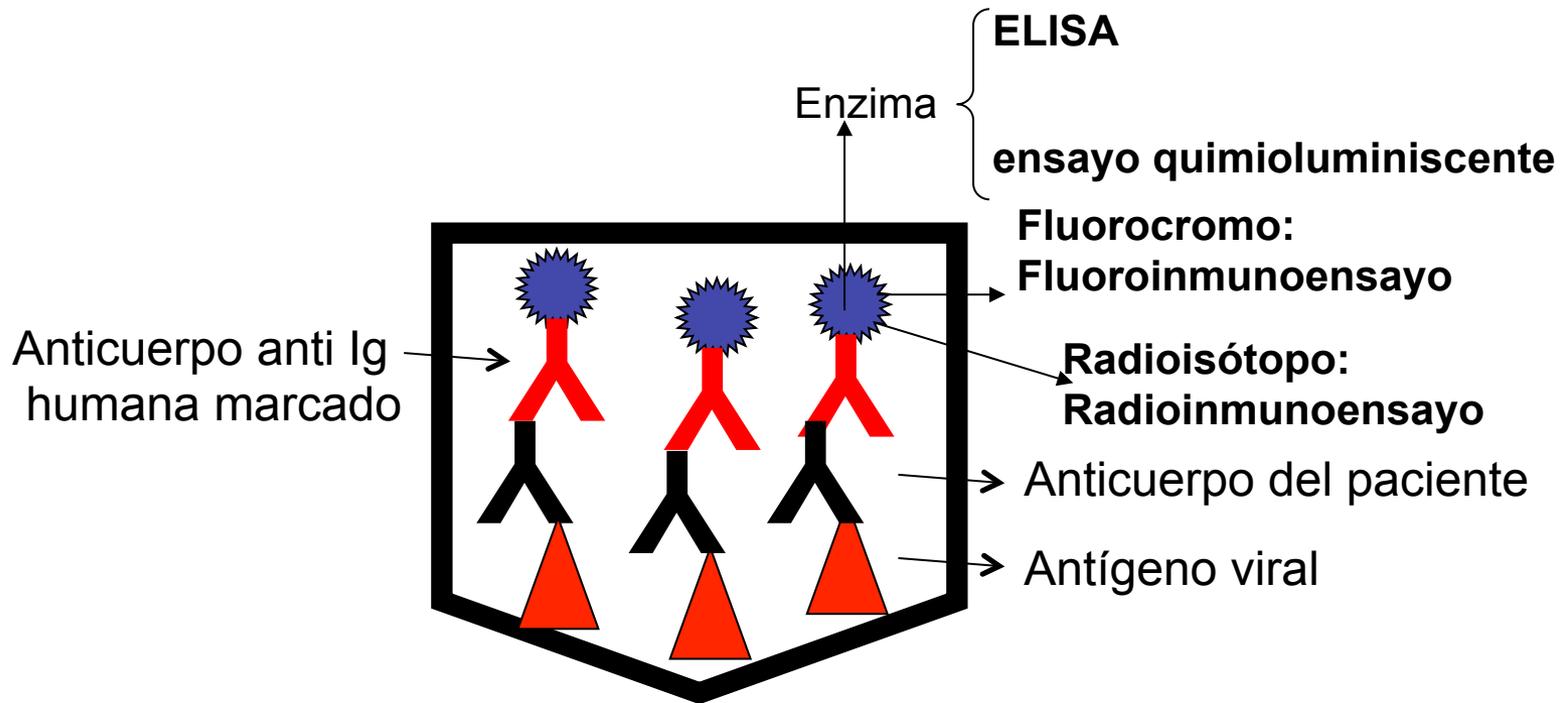
Métodos indirectos

Se basan en la búsqueda de anticuerpos específicos en suero del paciente.



Métodos indirectos

Inmunoensayos en Fase Sólida



Métodos indirectos

Interpretación del resultado

Una señal superior a un valor umbral indica presencia de anticuerpos anti-proteínas virales.

Es posible discriminar isotipos de inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA.

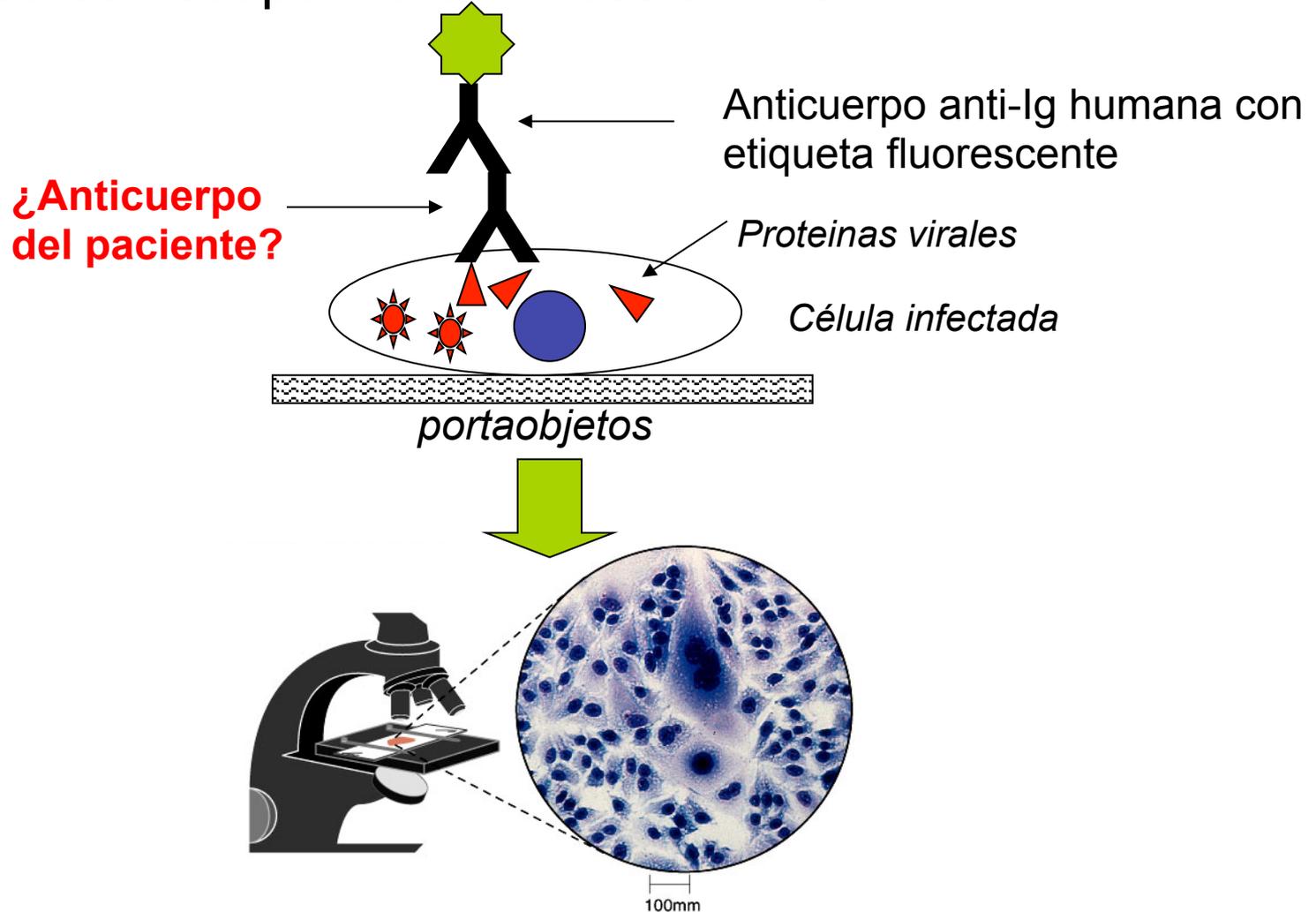
La presencia de IgM anti-proteínas virales indica infección reciente.

La presencia de IgG anti-proteínas virales indica infección pasada. Un aumento significativo en los niveles de IgG también es indicio de infección reciente.

Métodos indirectos

Inmunofluorescencia indirecta

Detección de anticuerpos anti-proteínas virales en sueros de pacientes con sospecha de infección viral.



Métodos indirectos

Interpretación del resultado

Una imagen fluorescente es indicio de presencia de anticuerpos anti-proteínas virales en el suero.

Es posible discriminar isotipos de inmunoglobulinas IgG, IgM E IgA.

La presencia de IgM anti-proteínas virales indica infección reciente.

La presencia de IgG anti-proteínas virales indica infección pasada. Un aumento significativo en los niveles de IgG también es indicio de infección reciente.

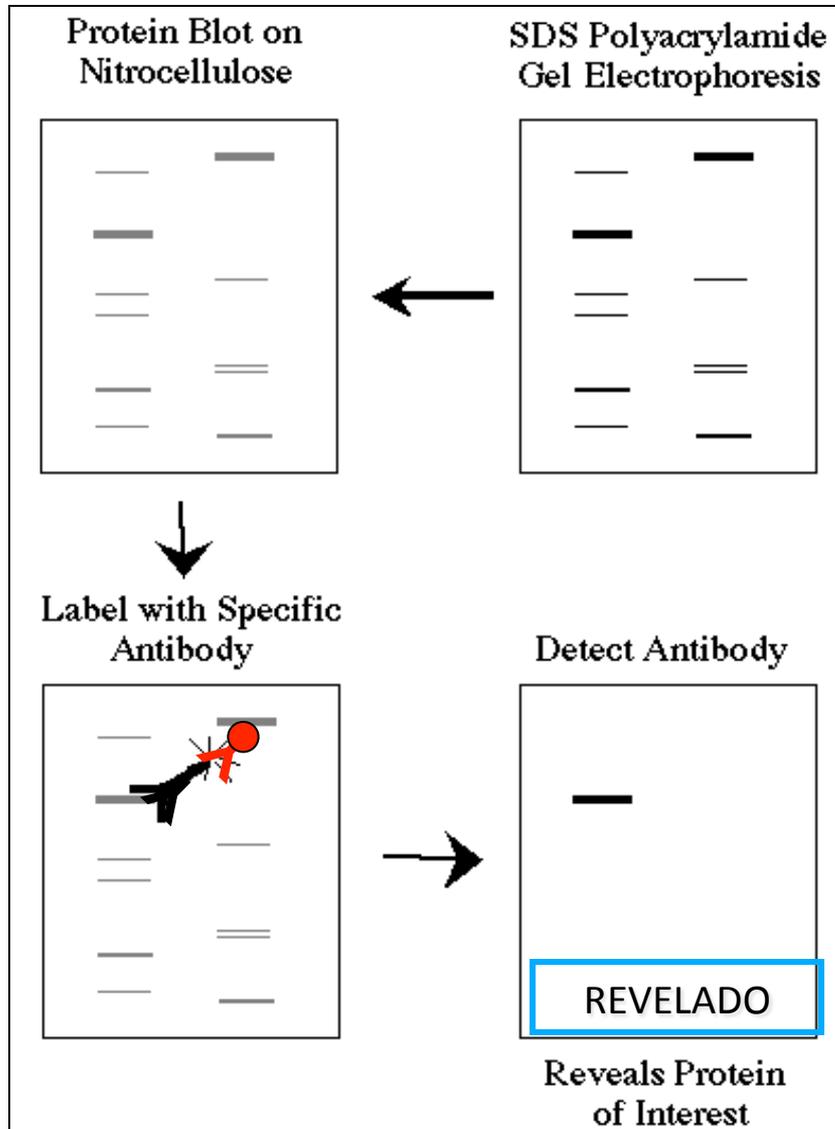
Métodos indirectos

WESTERN BLOT

Etapas:

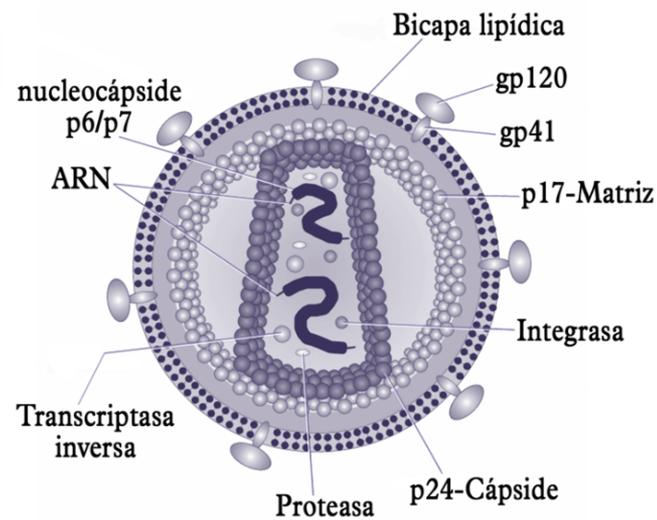
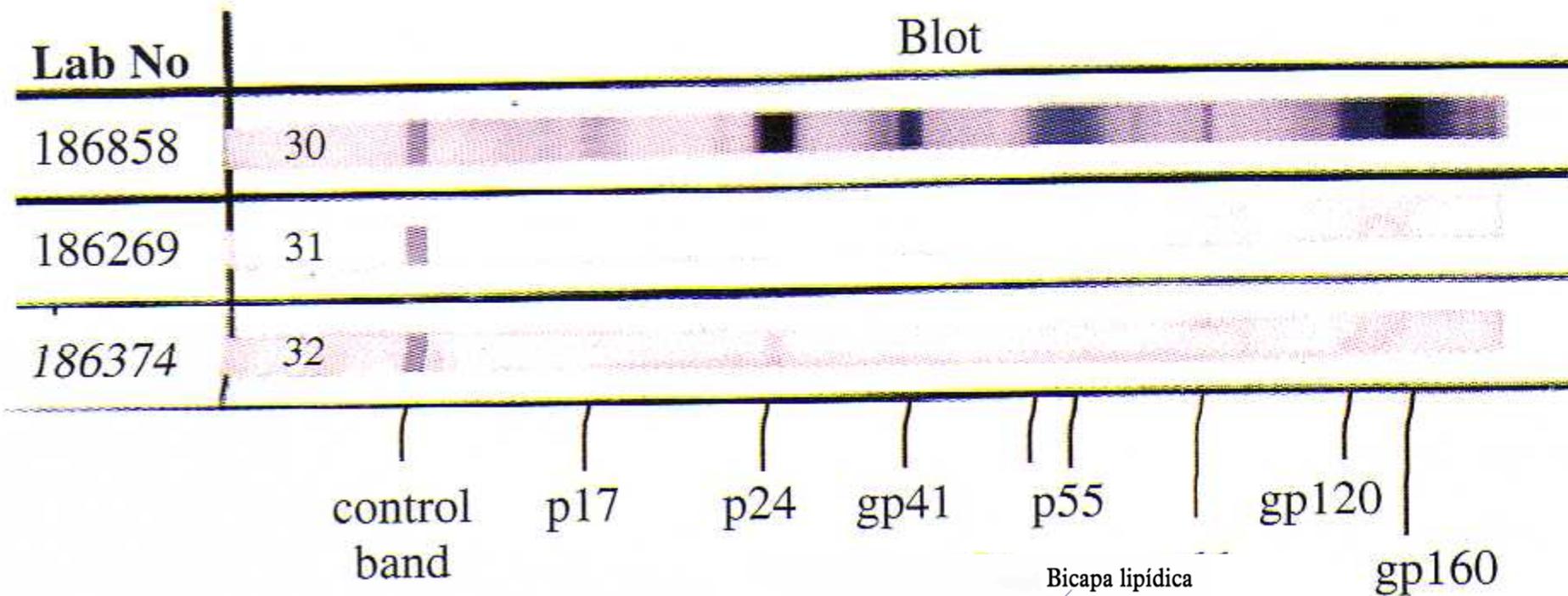
- Separación electroforética de proteínas en una muestra en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)
- Transferencia (blotting) de estas proteínas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa)
- Incubación con Ac de pacientes
- Revelado con un Ac anti-Ig humana marcado con una enzima

Métodos indirectos



Proteínas virales separadas electroforéticamente

Métodos indirectos



Métodos indirectos

Interpretación de resultados

Permite discriminar distintas inmunorreactividades en los sueros de pacientes, en base a los distintas proteínas virales reconocidas por sus anticuerpos.

En el caso de infecciones por HIV, es el método confirmatorio en individuos positivos por ELISA.

