

UD9. VIROLOGÍA

Isabel Fernández Fernández

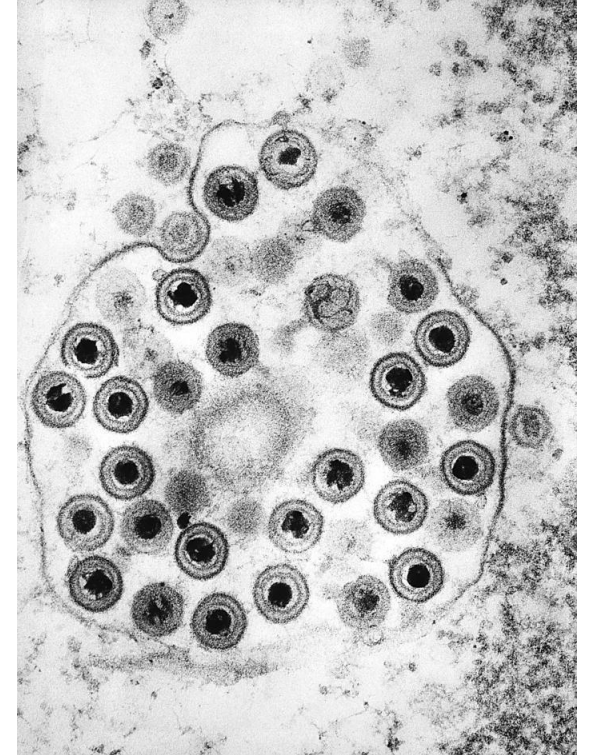
CONTIDOS

1. ESTRUCTURA DOS VIRUS
2. REPLICACIÓN VIRAL
3. CLASIFICACIÓN DOS VIRUS
4. VIRUS DE IMPORTANCIA CLÍNICA
5. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN
6. DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES VÍRICAS FRECUENTES

1

DEFINICIÓN DE VIRUS

- Os **virus** son entidades infecciosas microscópicas que so poden multiplicarse dentro das células doutros organismos.
- Para a súa replicación necesitan a maquinaria enzimática dunha célula, posto que carecen de mecanismos propios para a obtención de enerxía e a síntese proteica: compórtanse como **parasitos intracelulares obrigados**.
- Caracterízanse por presentar unha **alta especificidade de hóspede**.

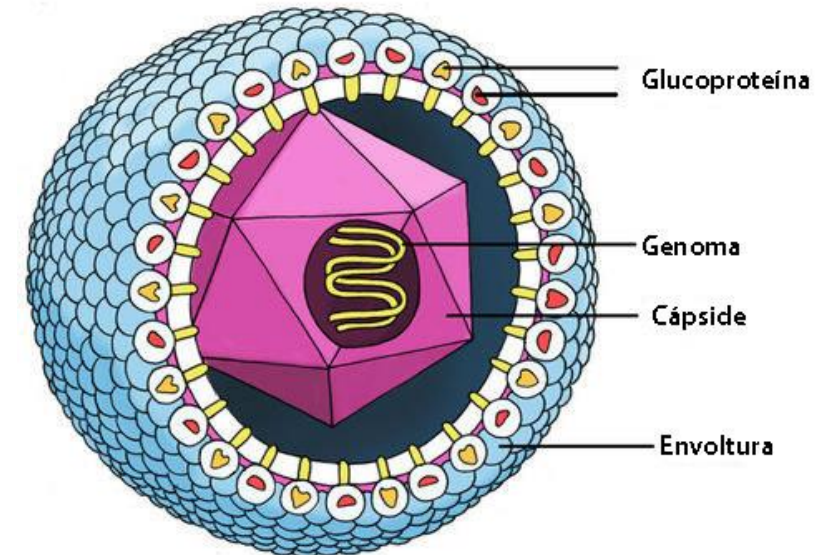


Viriões do Herpes simple. Microscopía electrónica de transmisión. Fonte: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10231>

ESTRUTURA DOS VIRUS

- A estrutura dos virus é moi simple: están formados por unha molécula *de ácido nucleico* (*xenoma*) recuberta por unha *cápside* e poden presentar nalgúns casos unha *envoltura externa*.
- O virus completo (ácido nucleico + cápside + envolta + glicoproteínas) denomínase partícula viral ou *virión*.

A estrutura pode variar duns virus a outros, así o xenoma pode ser ADN ou ARN, a forma da cápside pode ser icosaédrica ou helicoidal e poden presentar envoltura externa ou non.



Estrutura xeral dun virus.

ESTRUTURA DOS VIRUS

2.1 Xenoma

O xenoma dos virus está formado por unha cadea de ácido nucleico, que puede ser:

- **ADN** ou **ARN**.
- **Monocatenario** (*ss*, single-stranded) ou **bicatenario** (*ds*, double-stranded).

Xeralmente, o ácido nucleico está asociado con algunhas moléculas proteicas, que poden ter actividade enzimática ou intervir na estabilización do pregamento do ácido nucleico.

O conxunto formado polo xenoma e as proteínas asociadas a él denomínase núcleo, nucleoproteína, nucleoide ou core.

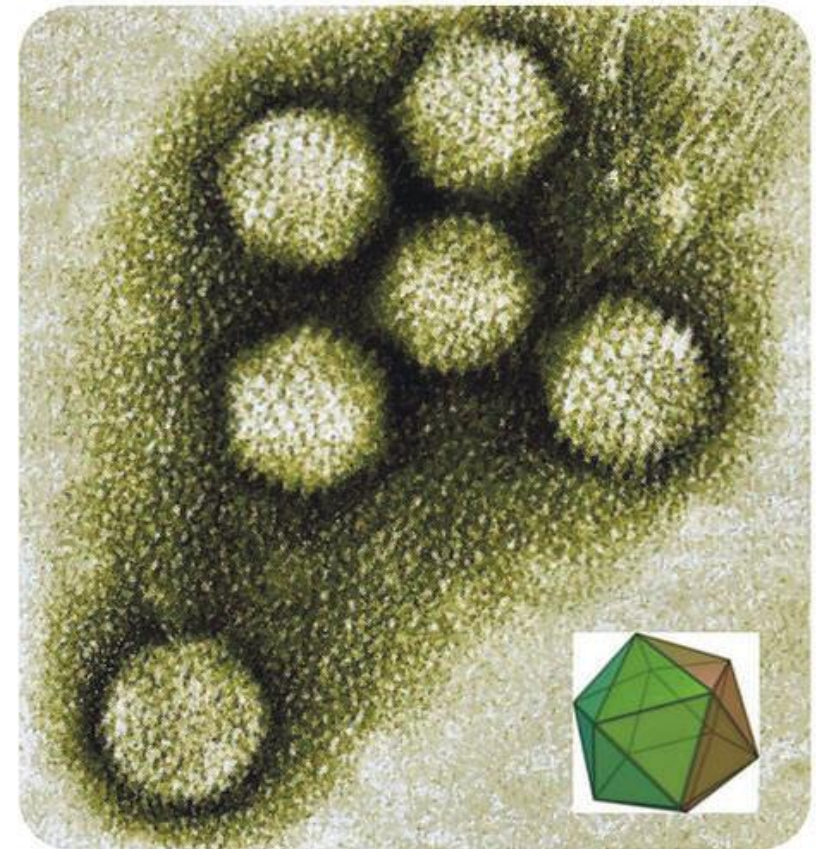
2.2 Cápside

- Trátase dunha cuberta proteica que se compón de subunidades denominadas **capsómeros**, que se ensamblan entre sí mediante enlaces non covalentes.
- O conxunto formado polo núcleo e a cápside denomínase **nucleocápside**.
- As proteínas que forman a cápside están codificadas polo xenoma viral.
- A forma da cápside é un criterio de clasificación viral.

2.2 Cápside

Forma icosaédrica

- Adoptan aspecto esférico, pero en realidade forman unha estrutura icosaédrica (poliedro de 20 caras e 12 vértices) pola repetición dunha única proteína. A forma icosaédrica é a forma máis eficiente para crear unha estrutura resistente a partir de múltiples copias dunha soa proteína. O feito de que se forme a partir da repetición dunha única proteína tamén aforra espazo no xenoma viral.



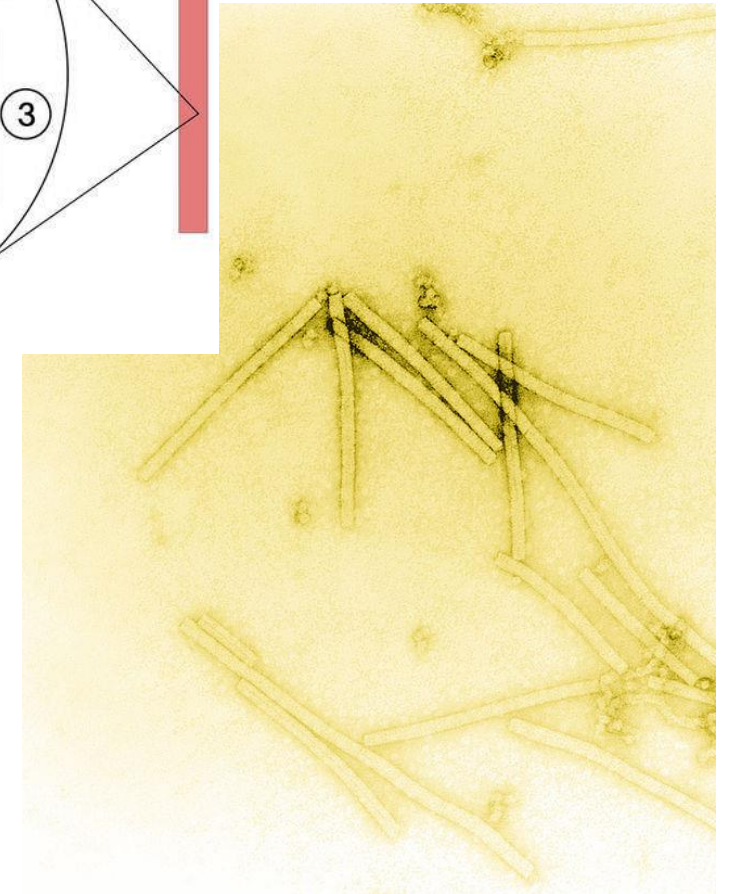
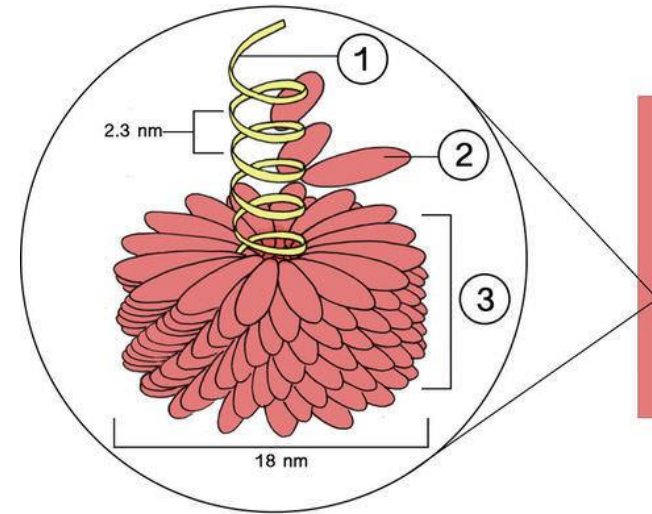
Adenovirus. Estrutura icosaédrica.

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Enteric_Adenoviruses.jpg

2.2 Cápside

Forma helicoidal

- Adoptan aspecto cilíndrico ou filamentoso.
- Os capsómeros dispóñense ó redor do ácido nucleico.
- Os virións resultantes poden ser curtos e ríxidos ou longos e flexibles.

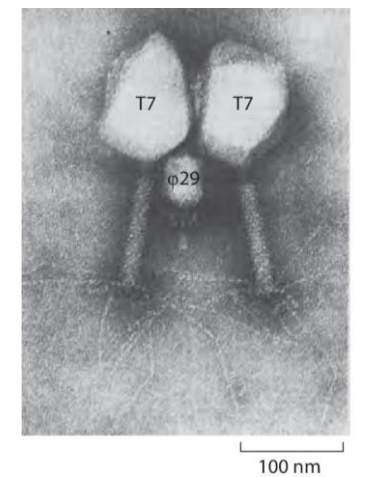
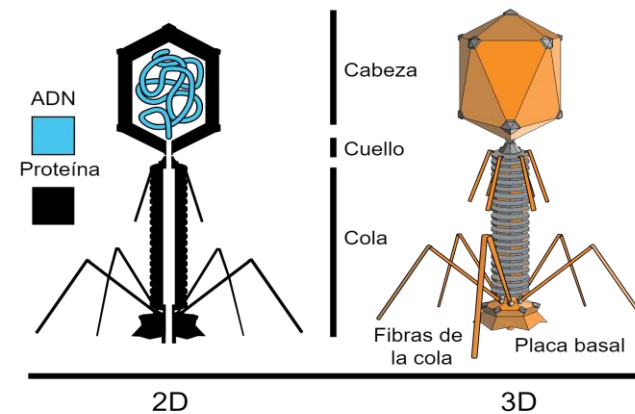
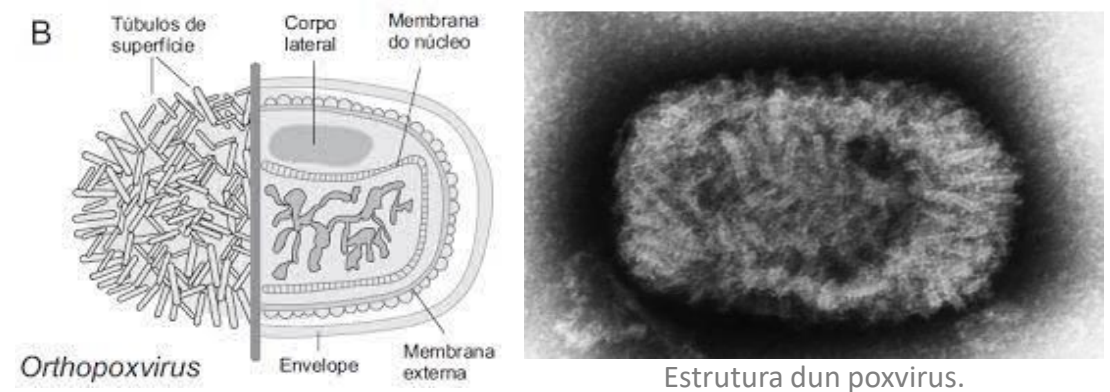


Estrutura helicoidal do virus do mosaico do tabaco.

2.2 Cápside

Estruturas complexas que non se corresponden coa icosaédrica ou helicoidal

- **Poxvirus:** teñen unha estrutura complexa que non se corresponde coa simetría icosaédrica nin coa helicoidal. A superficie externa do virión presenta crestas. É un virus envolto.
- **Bacteriófagos** (virus que infectan bacterias): presentan unha cápside icosaédrica e unha cola helicoidal, proteicas.



Estrutura dun bacteriófago.

2. Envolta

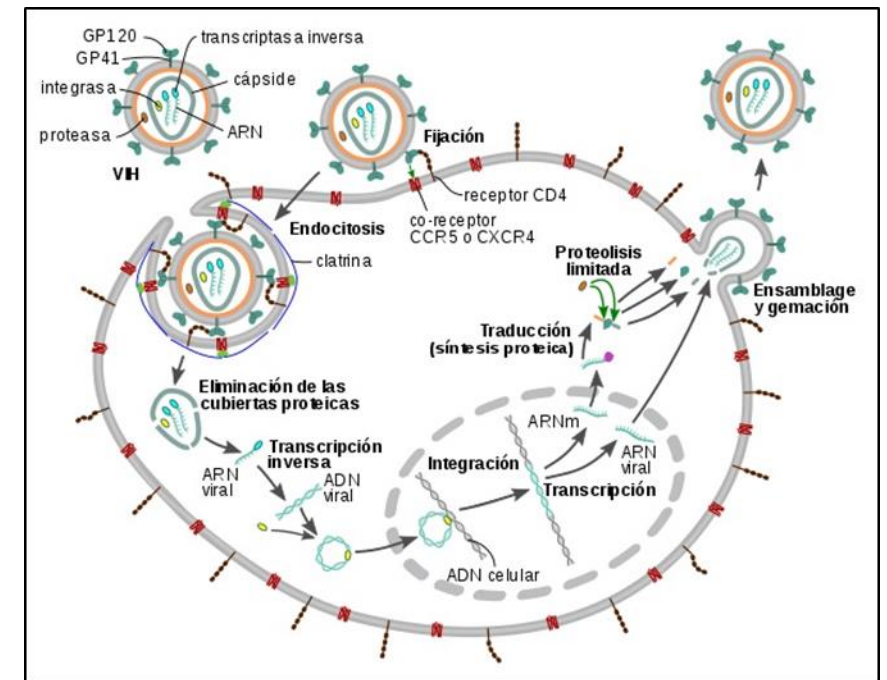
- Algúns virus ademais de cápside ,poden presentar unha cuberta lipídica que rodea a nucleocápside e que provén da célula que infectan, denominada **envolta**.
- A miúdo esta envolta pode presentar insertadas glicoproteínas, codificadas polo xenoma viral, denominadas **peplómeros**, que poden ter funcións biolóxicas variadas como acción neuraminidasa ou hemaglutinina.
- A envolta pode proporcionarlle ó virus certas vantaxes, como maior facilidade para burlar o sistema inmune do hóspede, ou unha maior facilidade de adsorción do virión ás células hóspede, porque recoñecen os receptores da envolta. Pola contra, a presenza de envolta fainos máis susceptibles a acción deterxentes que alteran os lípidos de membrana.
- Os virus que non presentan envolta denomínanse **virus nús**.

REPLICACIÓN DOS VIRUS

- Os virus precisan da maquinaria enzimática dunha célula para poder replicarse.
- A replicación consta de varias fases, con lixeiras modificacións ou pasos intermedios, dependendo do tipo de virus do que se trate. En xeral podemos falar das seguintes fases:
 - **Adsorción:** o virus reconece os receptores de membrana da célula hóspede e únese a eles.
 - **Penetración:** penetra por un proceso de endocitose na célula hóspede.
 - **Denudación:** eliminación das cubertas proteicas (cápside) e liberación do material xenético no citoplasma celular. O ácido nucleico penetra no núcleo onde se vai replicar (xera novas copias) e transcribirse (produce ARNm que sae ó citoplasma para a síntese de proteínas virais da cápside).
 - **Ensamblaxe:** as proteínas virais, os ácidos nucleicos e nalgúns casos enzimas virais, ensámblanse para forma os novos virións.
 - **Liberación:** cando os virións ós sair se rodean da membrana plasmática celular dá lugar ós virus envoltos.

REPLICACIÓN DOS VIRUS

- Ciclo de replicación lítico:** o virus penetra na célula hóspede e replícase de maneira inmediata, xerando novos virións que ó ser liberados provocan a lise celular.
- Ciclo de replicación lisoxénico:** neste caso as fases de adsorción, penetración e deanudación son similares ó ciclo lítico, pero a fase de replicación é tardía, porque o ácido nucleico do virus intégrase no xenoma da célula hóspede e permanece aí latente, podendo reactivarse e replicarse, ou tamén ser duplicado xunto co ADN celular e ser transmitido ás células fillas. A estes virus que permanecen latentes denomínaselle **virus atenuados ou profagos**.



Replicación do VIH. Replicación lisoxénica.

CLASIFICACIÓN DOS VIRUS

- Existe un **comité internacional de taxonomía de virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses)**, que se encarga de establecer unha clasificación e **nomenclatura estandarizada**. A clasificación consta de ordes, familias, subfamilias, xéneros e especies.
- Existe outra clasificación que se denomina **Método de Baltimore**, que divide a todos os virus en **sete categorías en función do tipo de ácido nucleico** que teñen e unha **última categoría** que inclúe axentes subvirais como: **viroides ou príons**.

LEMBRA:



Os viroides son moléculas de ARN circular nús, que infectan plantas.

Os príons son proteínas infecciosas patóxenas para animais. Poden transmitirse verticalmente ou horizontalmente (entre individuos da mesma especie ou incluso distinta especie). Unha das patoloxías máis coñecidas é a enfermidade de Creutz-feldt-Jakob (encefalopatía esponxiforme) en humanos.

CLASIFICACIÓN DOS VIRUS

4.1 Clasificación de Baltimore

- **Grupo I:** virus ADN bicatenario (dsDNA)
- **Grupo II:** virus ADN monocatenario (ssDNA)
- **Grupo III:** virus ARN bicatenario (dsRNA)
- **Grupo IV:** virus ARN de sentido positivo ((+)ssRNA)
- **Grupo V:** virus ARN de sentido negativo ((-)ssRNA)
- **Grupo VI:** virus ARN de transcripción reversa (ssRNA-RT)
- **Grupo VII:** virus ADN que realizan transcripción reversa (dsDNA-RT)
- **Axentes subvirais:** satélites, viroides e príons.

CLASIFICACIÓN DOS VIRUS



- **ADN bicatenario:** as ARN polimerasas da célula forman o ARNm a partir do ADN vírico. (Ex. : herpesvirus e poxvirus)
- **ADN monocatenario:** As ADN polimerasas da célula forman un ADN bicatenario a partir da monocadea vírica, e a partir deste ADN bicatenario o ARNm. (Ex.: parvovirus)
- **ARN bicatenario:** o seu núcleo inclúe unha ARN polimerasa dependente de ARN que forma ARNm a partir da hebra negativa do ARN bicatenario. (Ex.: Reovirus)
- **ARN monocatenario de sentido positivo** ten a mesma secuencia de bases que o ARNm, o que significa que o ARN viral de sentido positivo pode actuar como molde para traducirse directamente a proteínas. (Ex.: Coronarivirus)
- **ARN monocatenario de sentido negativo** é complementario do ARNm, e polo tanto deberá ser transcrito primeiro a ARNm para posteriormente ser traducido a proteínas. (Ex.: Rhabdovirus, Orthomixovirus)
- **ARN monocatenario retrotranscrito (ARN_{mc}-RT):** o seu núcleo inclúe unha transcriptasa inversa (RT), que a partir de ARN transcribe primeiro unha molécula de ADN e despois outra, para formar un ADN bicatenario, e a partir deste as enzimas celulares sintetizan o ARNm. (Ex.: Retrovirus)
- **ADN bicatenario retrotranscrito (ADN_{bc}-RT):** as ARN polimerasas da célula sintetizan o ARNm a partir do ADN vírico. Despois o ARNm encapsúlase e mediante unha transcriptasa inversa vírica, transcribe primeiro unha molécula de ADN e despois a outra, para formar un ADN bicatenario, que é o xenoma vírico. (Ex.: hepadnavirus)

Virus ADN			
Desnudo	<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus	Infecciones respiratorias
	<i>Hepadnaviridae</i>	Virus de la hepatitis B (VHB)	Hepatitis B
	<i>Papovaviridae</i>	Virus del papiloma humano (VPH)	Verrugas en manos, pies o región anogenital
	<i>Parvoviridae</i>	Parvovirus B19	Eritemas en las mejillas en niños y niñas
Envuelto	<i>Herpesviridae</i>	Herpesvirus simple 1 (VHS-1)	Herpes labial
		Herpesvirus simple 2 (VHS-2)	Herpes genital
		Herpesvirus varicela-zóster (VVZ)	Varicela, herpes zóster
		Virus de Epstein-Barr (VEB)	Mononucleosis infecciosa (enfermedad del beso)
		Citomegalovirus (CMV)	Enfermedad citomegálica; Síndrome mononucleósico
		Herpesvirus tipos 6 y 7	Exantema súbito
		<i>Poxiviridae</i>	Virus de la viruela

VIRUS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

		Virus ARN	
Desnudo	<i>Caliciviridae</i>	Virus Norwalk	Gastroenteritis aguda
		Virus Saporo	Gastroenteritis aguda
	<i>Hepeviridae</i>	Virus de la hepatitis E (VHE)	Hepatitis E
		Poliovirus	Poliomielitis
		Virus Coxsackie	Fiebre aftosa humana
	<i>Picornaviridae</i>	Rhinovirus	Catarro común
		Aphthovirus	Enfermedad boca-pie
		Virus de la hepatitis A (VHA)	Hepatitis A
	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	Diarrea grave infantil

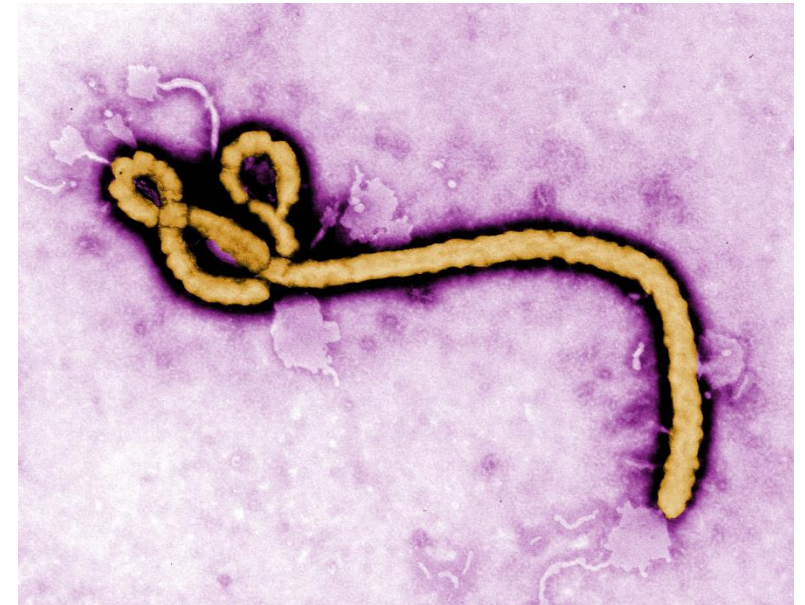
VIRUS ARN

Envuelto	<i>Arenaviridae</i>	Mammareanvirus	Virus de la fiebre de Lassa
	<i>Bunyaviridae</i>	Hantavirus	Fiebre hemorrágica viral
	<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus (SARS-CoV-2)	COVID-19
	<i>Deltaviridae</i>	Virus de la hepatitis D (VHD)	Hepatitis D
	<i>Filoviridae</i>	Virus de Marburgo	Fiebre hemorrágica
		Virus del Ébola	Ébola
		Virus de la fiebre amarilla	Fiebre amarilla
		Virus del Nilo occidental	Encefalitis del Nilo
	<i>Flaviviridae</i>	Virus del dengue	Dengue
		Virus del Zika	Microcefalia durante la gestación
		Virus de la hepatitis C (VHC)	Hepatitis C
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus de la influenza (A, B, C, D)	Gripe
	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Morbillivirus</i>	Sarampión
		Virus de la parainfluenza	Parotiditis (paperas)
	<i>Pneumoviridae</i>	Virus respiratorio sincitial (VRS)	Resfriado, principalmente en niños y niñas de corta edad
	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	Diarrea grave infantil
	<i>Retroviridae</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	Sida
	<i>Rhabdoviridae</i>	Virus de la rabia	Rabia
		Vesiculovirus	Estomatitis vesicular
<i>Togaviridae</i>	Virus chikunguña	Chikunguña	
	Rubivirus	Rubeola	

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN

Para a identificación de virus preséntansenos dous problemas fundamentais:

- **Son parasitos intracelulares obrigados:** polo tanto só se replican dentro das células que infectan. Non podemos cultivalos en medios de cultivo convencionais como os utilizados para as bacterias, senón que temos que recorrer a cultivos en liñas celulares, que son costosas de manter e para o cal se require experiencia.
- **Tamaño:** non forman colonias que poidamos observar a simple vista, e o seu tamaño (da orde de nm), salvo algunha excepción, non é compatible coa utilización de microscopía óptica. É necesario utilizar microscopía electrónica para poder velos.



Virus do ébola. Virus filamentoso de simetría helicoidal, envolto. Microscopía electrónica de transmisión. Fonte:

<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10815>

6.1 Recollida e transporte das mostras

- A petición de análise debe indicar o **tipo de mostra** e a **sospeita clínica do virus** en estudo. Así como tamén, a advertencia da posibilidade da presenza de axentes perigosos para o persoal do laboratorio, se é o caso.
- As mostras deben recollese nas **primeiras 48-72 horas da infección**, que é cando se rexistra unha concentración máis alta de virus que aínda non se uniron a anticorpos.
- As mostras deben **transportarse refrixeradas ó laboratorio e ser procesadas nas 12-24 horas** postrecollida. A mostra debe manterse refrixerada a 4°C ata o seu procesamento, pero no caso de non poder ser procesada pode manterse conxelada a -20°C durante 5 días, e se é necesario conservar durante máis tempo conxelarse a -70°C.
- Dependendo do tipo de mostra pode ir incluída nun **medio de transporte** que contén proteínas que estabilizan o virus, axentes antimicrobianos que impiden a proliferación de bacterias e fungos, e solución amortiguadora de pH.

6.1 Recollida e transporte das mostras

Tipo de muestra	Tipo envase	Cantidad / transporte
Heces	Frasco estéril o limpio.	Al menos 4 g de muestra. Mantener a 4 °C hasta llegar al laboratorio.
Fluidos o secreciones	Material usado en la obtención: jeringa (LCR) o sonda (aspirado nasofaríngeo o traqueal).	Muestras respiratorias: con medio de transporte viral. LCR, orina o leche materna: sin medio de transporte. Mantener a 4 °C hasta llegar al laboratorio.
Hisopado o cepillado	Cepillo flexible.	Si se requiere aislamiento viral: con medio de transporte viral. Mantener a 4 °C hasta llegar al laboratorio.
Sangre	Tubo sin anticoagulante (tapón rojo) para pruebas en suero. Tubo con anticoagulante (tapón lila) para pruebas en sangre total o plasma.	Entre 5 y 10 ml en personas adultas. No agitar para evitar la hemólisis. Mantener a 4 °C hasta llegar al laboratorio.

6.2 Procesamento das mostrás

- Cada laboratorio establecerá os protocolos de diagnóstico, cos tipos de cultivos celulares a empregar e as probas diagnósticas a realizar, en función do tipo de mostra e virus sospeitado.
- No procesamento das mostrás débense adoptar as medidas de bioseguridade que correspondan ó nivel de risco do axente vírico.
- As mostrás manipularanse en cabina de bioseguridade, e evitarase abrir dúas mostrás distintas ó mesmo tempo, para evitar contaminacións cruzadas por aerosois ou derrames.
- O virus do VIH ou o da febre amarela require nivel de bioseguridade III, por exemplo, mentres que o virus do ébola, virus Marburgo ou o da febre de Lassa requiren laboratorios de seguridade de nivel IV.

6.3 Cultivo celular

- O cultivo de virus pode realizarse sobre modelos animais de laboratorio, sempre coa autorización do comité ético de experimentación animal ou sobre cultivos celulares mantidos in vitro.
- Os cultivos celulares mantéñense viables en medios nutritivos líquidos que permiten a viabilidade e multiplicación das células, en frasco ou en tubo.



Frascos con medio de cultivo para cultivo celular.

6.3 Cultivo celular

Os cultivos celulares poden ser de dous tipos:

- **Cultivos celulares primarios:** son células obtidas directamente da trituración de ril ou pulmón de animais. Estas células inocúlanse no caldo de cultivo nutritivo e mantéñense viables varios días. Non se poden multiplicar no cultivo.
- **Liña celular:** son células obtidas por procedementos similares ós cultivos primarios pero que teñen capacidade para multiplicarse. Hai dous tipos de liñas celulares:
 - **Liñas celulares contínuas:** poden multiplicarse indefinidamente. Suelen obterse de células neoplásicas humanas como de cancro de pulmón, larinxe ou cérvix uterino.
 - **Liñas celulares semicontínuas:** permanecen óptimas durante 40-70 pases.

6.3 Cultivo celular

Liñas celulares utilizadas
frecuentemente

Cultivo celular artificial		Origen y características		Virus que se replican
Cultivo primario		RMK	Riñón mono Rhesus	Virus del sarampión Influenzavirus Parainfluenzavirus Virus respiratorio sincitial
Líneas celulares	Semicontinuas	MRC5	Fibroblastos de pulmón embrionario humano	Adenovirus Citomegalovirus Herpesvirus Rinovirus
	Continuas	HEP-2	Carcinoma laríngeo humano	Adenovirus Virus respiratorio sincitial Enterovirus
		MDCK	Diploide de riñón canino	Influenzavirus
		Vero	Riñón mono verde africano	Parainfluenzavirus Virus de la rubeola
		HeLa	Carcinoma cervical humano	Adenovirus Rinovirus
	RD	Rabdomiosarcoma humano	Enterovirus Herpesvirus Adenovirus	

6.3 Cultivo celular

Efecto citopático

- Os virus en cultivo **non forman colonias visibles** como as bacterias, e **non poden verse con microscopía óptica**. A detección da presenza de virus baséase na observación dos efectos que producen sobre as células do cultivo celular. Estes cambios que exercen sobre o cultivo celular denomínase efecto citopático.

Efecto citopático: conxunto de cambios visibles ó microscopio óptico, que o ciclo de replicación viral produce nas células hospedoras do cultivo.

- O **efecto citopático implica cambios na morfoloxía da célula hospedadora**, que poden consistir en: redondeamento, dexeneración, presenza de corpúsculos, fusión celular, incorporación de antígenos á membrana plasmática ou morte celular por autólise.
- O tipo de liña celular sobre a que se replica o virus (especificidade) e o efecto citopático que produce, poden ser criterios suficientes para unha identificación definitiva do virus.

As mostras de líquidos estériles poden inocularse directamente nos medios de cultivo celulares, mentres que as mostras que proceden de zonas con microbiota comensal, suelen tratarse con antibacterianos e antifúngicos antes da inoculación.

6.3 Cultivo celular

Titulación da carga viral

A titulación viral, consiste na estimación do número de partículas virais ou unidades infecciosas por unidade de volume, presentes nunha mostra.

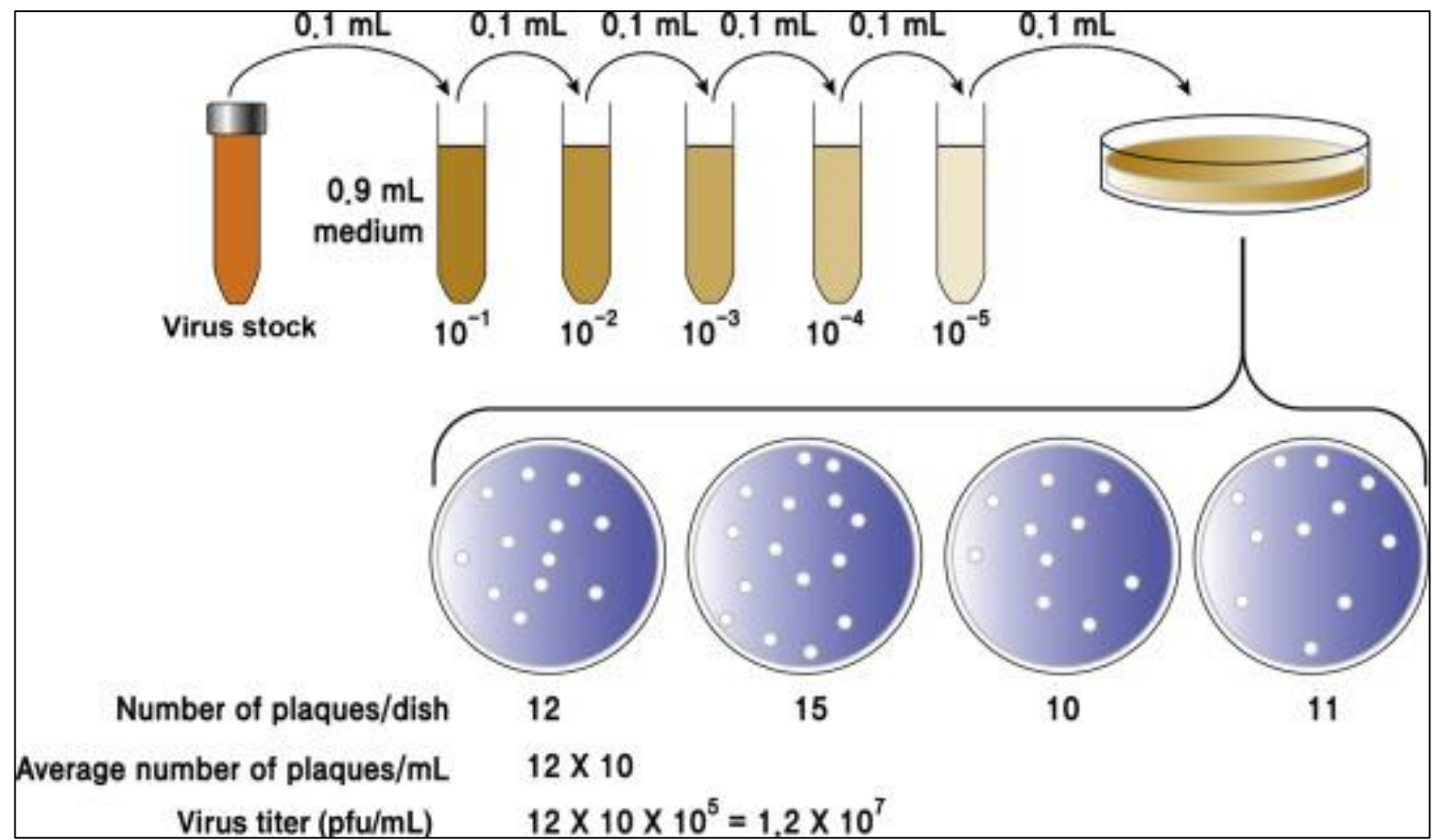
A técnica máis amplamente utilizada para a titulación viral é o ensaio en placa, que consiste en cultivos celulares que se inoculan con dilucións seriadas da mostra, e tras un periodo de incubación de 2-3 horas cúbrese a monocapa cun medio semisólido para impedir que as novas partículas virais poidan migrar ou difundir a través do medio. Ó cabo de 2-3 ciclos de replicación viral, poderán observarse placas de lise ó redor de cada célula infectada inicialmente. Cada placa de lise representa unha unidade formadora de placa (UFP). As células non infectadas tínguense para poder detectar facilmente as placas de lise. Os resultados exprésanse como UFP/ml.

6 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN

6.3 Cultivo celular

Titulación da carga viral

Esquema do procedemento para a titulación da carga viral: ensaio en placa.



6.3 Cultivo celular

Cultivo celular acelerado en *Shell vial*

Pénsase que a centrifugación a baixa velocidade, provoca traumatismos menores na superficie celular, o que facilitaría a adherencia e penetración do virus na célula.

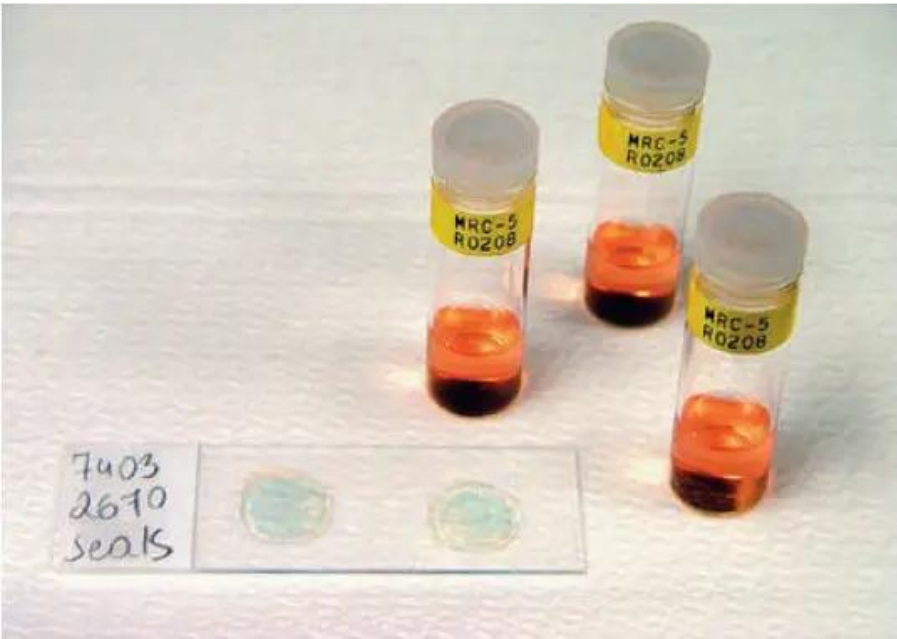
- O cultivo celular acelerado en *Shell vial*, é unha variante do cultivo celular convencional que permite detectar os virus con maior rapidez, **mellorando a adherencia e penetración do virus nas células hóspede**.
- O cultivo en *Shell vial* consiste nun cultivo en tubos-ampolla de fondo plano, no que se coloca un cubreobxetos redondo no fondo, cúbrese con medio de cultivo, e sobre o cubreobxetos desenvólvese unha monocapa de células hóspede (hai dispoñibles comercialmente, tubos *Shell vial* coas monocapas de células xa crecidas).
- Estes tubos *Shell vial* son inoculados co virus en estudo, soméntense a **centrifugación a baixa velocidade para favorecer a adherencia e penetración do virus**, e incúbanse a 35°C. Tras 24 e 48 horas postincubación engádense **anticorpos monoclonais específicos marcados con fluoresceína** para detectar os antíxenos virais.

6 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN

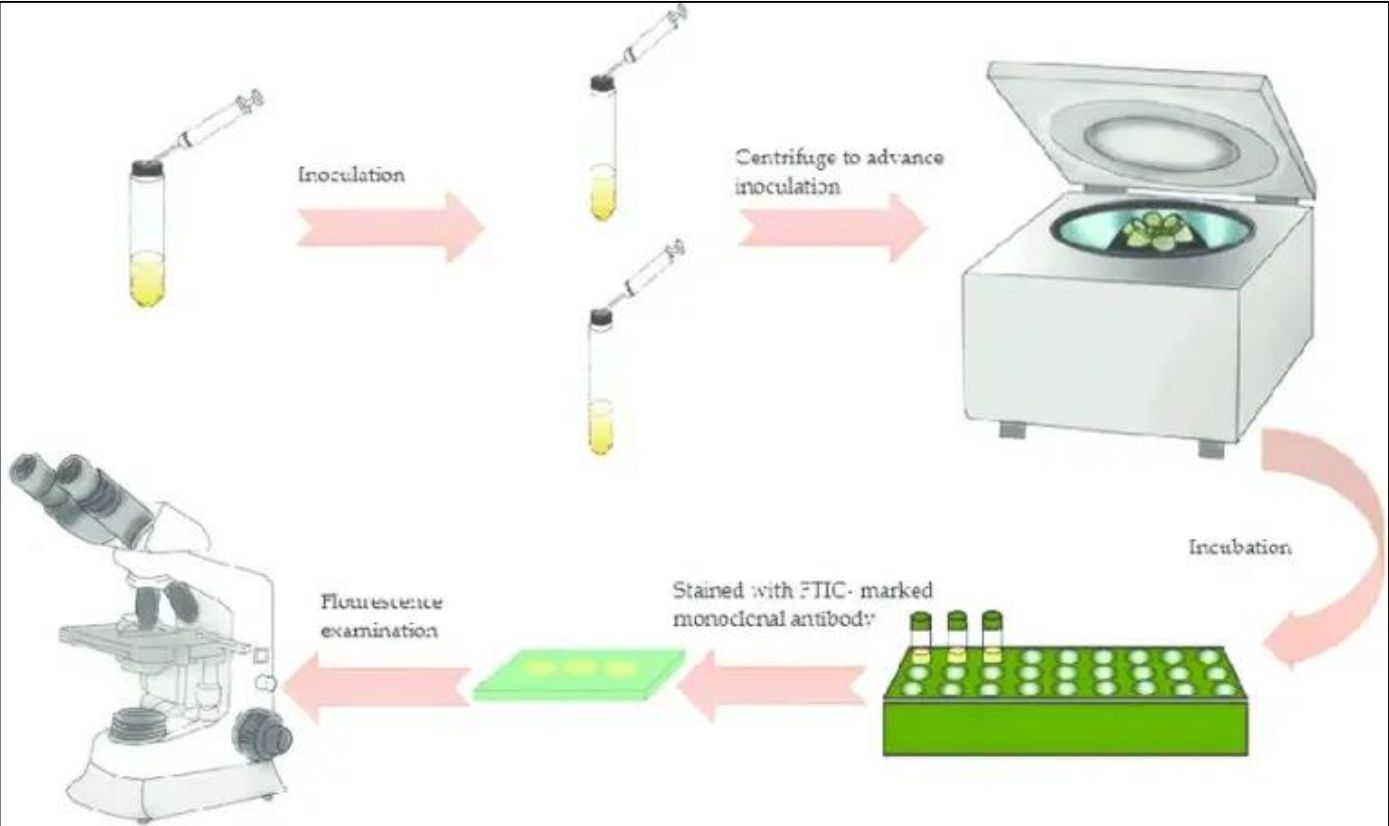
6.3 Cultivo celular

Cultivo celular acelerado en *Shell vial*

Necesitamos un Shell vial para cada virus. No caso de coinfecciones por varios virus, podemos utiliza un



Tubos con cubreobjetos con monocapa celular no fondo, sumerxidos en medio de cultivo e inoculados co virus. Mostra en porta marcada con fluoresceína, lista para observación.



Esquema do procedemento para o cultivo celular en *Shell vial*.

6.3 Cultivo celular

Cultivo celular acelerado en *Shell vial*

➤ Vantaxes do método:

- Permite identificar a maioría dos virus que medran en cultivos celulares convencionais, en tempos de 24 a 48 horas, e resulta especialmente útil para aqueles que requiren de longos periodos de incubación para producir efectos citopáticos. Utilízase para virus como:
 - Citomegalovirus (CMV)
 - Virus varicela-zoster (VZV)
 - Virus do herpes simple (VHS)
 - Adenovirus
 - Virus da influenza A e B
 - Virus parainfluenza 1,2,3
 - Virus respiratorio sincitial (VSR)

6.3 Cultivo celular

Cultivo celular acelerado en *Shell vial*

➤ Limitacións do método:

- Só se pode identificar un tipo de virus por vial. Por exemplo unha mostra que se sospeite que poida conter influenza A e B, ou adenovirus, necesitaría ser inoculada con tres conxugados específicos de virus separados. Esta limitación pode superarse mediante o uso de anticorpos combinados, seguido de tinción con conxugados de anticorpos individuais, no caso de resultar positivos na proba de anticorpos combinados anterior.

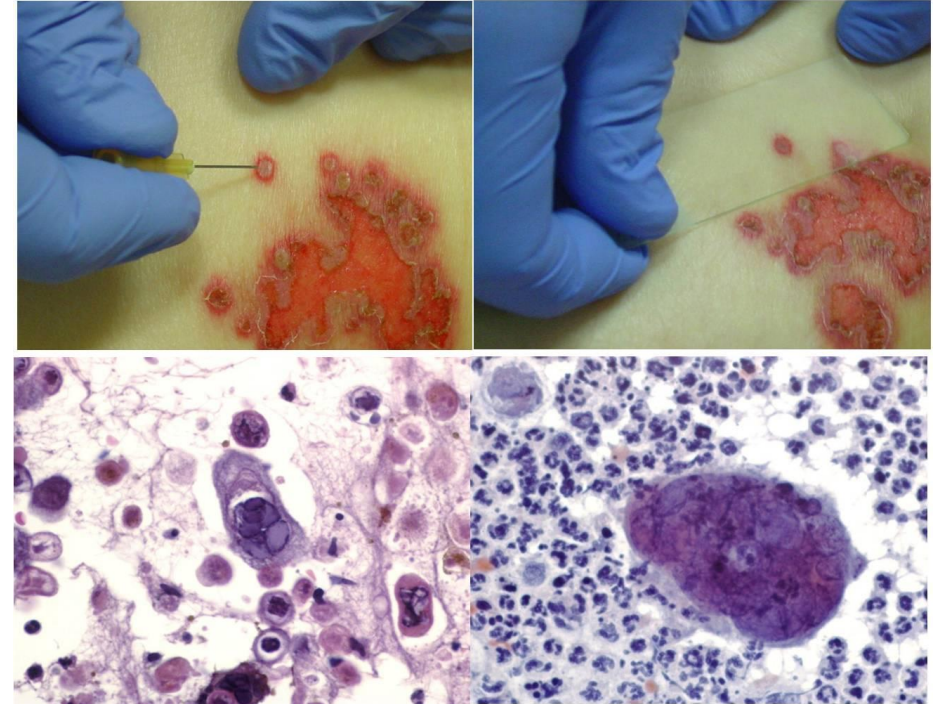
6.4 Microscopía óptica

- Aínda que o tamaño dos virus limita o uso da microscopía óptica para o seu diagnóstico, no caso dalgúns herpesvirus é posible o diagnóstico mediante exame directo de frotis citolóxicos tinguidos con Giemsa.
- Hai oito tipos de herpes que infectan humanos, e aínda que dependendo do tipo de herpes o cadro clínico que provocan é moi diferente, teñen en común que provocan unha infección inicial e que despois permanecen en estado latente, podendo reactivarse en calquera momento.
- Os herpes virus simple tipo 1 e 2 e o virus varicela – zoster (herpes tipo 3) poden identificarse mediante exame directo de lesións cutáneas. Esta proba denomínase **test de Tzanck**.
- O test de Tzanck é unha proba sinxela e rápida moi utilizada en clínica, porque non require de medios ou técnicas complexas.

6.4 Microscopía óptica

Test de Tzanck

1. Tómase unha mostra do líquido das vesículas ou faise un frotis das lesións úlcero-costrosas.
2. Fíxase a mostra no portaobxetos.
3. Tínguese con Giemsa ou Azul de toluidina.
4. Obsérvase ó microscopio óptico para ver se hai efecto citopático.

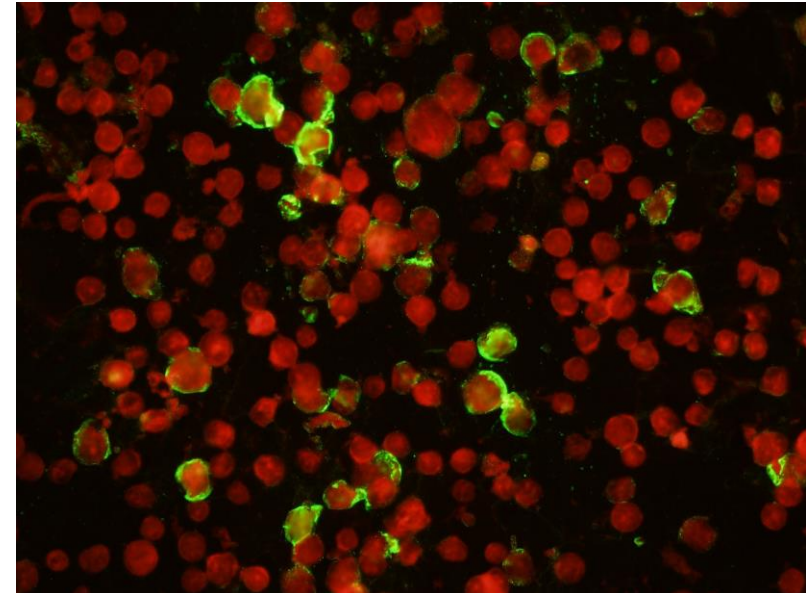


Imaxes superiores: Procedemento Test de Tzanck. Imaxes inferiores: Célula xigante multinucleada con inclusións nucleares.

Se o test é positivo observaranse células xigantes multinucleadas con inclusións intranucleares

6.5 Microscopía de fluorescencia

- En viroloxía a técnica de microscopía por excelencia é a **inmunofluorescencia, directa ou indirecta**. A inmunofluorescencia directa é máis rápida e específica mentres que a indirecta é máis sensible, polo que esta última estará indicada cando se sospeita dunha carga viral baixa na mostra.

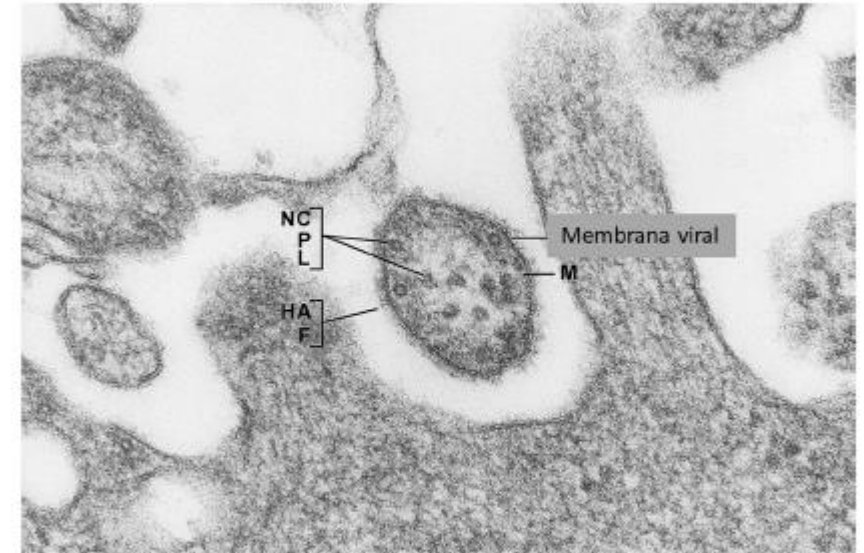


Virus influenza A. Inmunofluorescencia indirecta positiva.

6.6 Microscopía electrónica

- A microscopía electrónica permite estudiar a estrutura e tamaño das partículas víricas.
- Non é unha práctica que se aplique de forma rutinaria nun laboratorio de microbioloxía clínica, aínda que sí resulta útil para a detección de virus que medran mal en cultivo celular, como o do **sarampelo**, por exemplo.
- Unha das prácticas máis utilizadas en microscopía electrónica é a tinción negativa, onde se mezcla unha suspensión do virus cunha sustancia electrodensa que rodea o contorno e cubre a superficie do virus, de maneira que cun microscopio electrónico de transmisión conseguimos unha imaxe *en negativo* dos virus.

Fig. 2.– Esta imagen de microscopía electrónica de transmisión revela la ultraestructura del virión de sarampión. La partícula viral tiene 100-200 nm de diámetro, con un ARN negativo de cadena simple



NC: nucleocápside; P: fosfoproteína; L: proteína grande;
HA: hemaglutinina; F: proteína de fusión; M: proteína de la matriz

Fuente: Brian WJ. Mahy MA, BSc, MA, PhD, ScD, DSc, para los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (de libre reproducción en <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=12733>)

Fonte: <https://www.medicinabuenaosaires.com/indices-de-2020/volumen-80-ano-2020-no-2-indice/sarampion/>

6.7 Técnicas inmunolóxicas

- **Seroloxía:** detección de anticorpos IgM ou IgG fronte a antíxenos virais específicos no soro sanguíneo do paciente.
 - **Reacción de fixación do complemento.** É unha técnica complexa e laboriosa. Básase na competencia polo complemento presente no soro, entre os complexos antígeno viral-anticorpo e complexos antígeno-anticorpo engadidos.
 - **Inhibición da hemaglutinación.** Básase en observar a perda da capacidade hemaglutinante do virus cando se forman os complexos antígeno viral-anticorpo.
 - **Reacción de neutralización.** Básase na perda da capacidade infectiva dun virus ó producirse a unión co anticorpo específico. Avalíase inoculando un cultivo celular co complexo antígeno-anticorpo e observando os efectos sobre as células hóspede.

6.7 Técnicas inmunológicas

- **Técnica de ELISA (enzimoinumoensaio).** Básase na fixación de anticorpos específicos para un determinado virus sobre unha matriz, á que se lle engade o soro do paciente. Se o virus está presente, formaranse os complexos antígeno viral-anticorpo. Engádese a continuación un segundo anticorpo unido a unha enzima (normalmente peroxidasa de rábano ou fosfatasa alcalina), que recoñecerá o complexo antígeno viral-anticorpo. Efectúanse varios lavados, para eliminar os anticorpos non unidos, e engádese por último o sustrato para a enzima que dará unha reacción coloreada visible a simple vista.

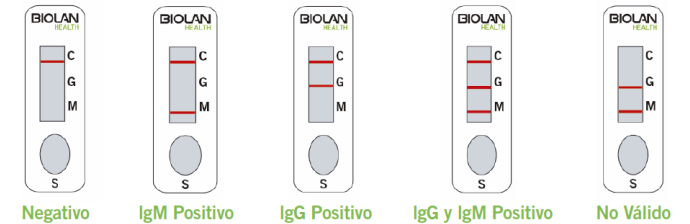


Detección do virus HIV mediante ELISA sandwich

É habitual o uso desta técnica na detección do virus respiratorio sincitial, rotavirus, virus da hepatitis A e B, virus Norwalk, adenovirus, parainfluenza e influenza.

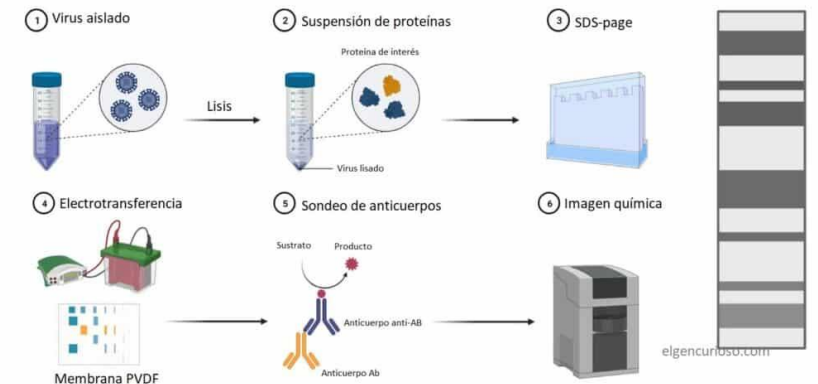
6.7 Técnicas inmunológicas

- **Inmunocromatografía.** Básase na detección de antígeno viral como consecuencia da súa unión a un anticorpo específico fixado sobre unha membrana de nitrocelulosa incluída nunha cámara de reacción portátil. Estas probas están disponibles para a detección do VIH, herpes simple, virus da gripe, coronavirus, virus respiratorio sincitial, etc.
- **Western blot.** Básase na detección de anticorpos antivirais no soro do paciente. Utilízase unha membrana de nitrocelulosa con proteínas virais fixadas que se incuba co soro do paciente. O revelado da proba faise engadindo un segundo anticorpo antiinmunoglobulina unido a unha enzima, e añadiendo un sustrato cromógeno.



Test para a detección do Covid-19.
Inmunocromatografía

Western Blot - Definición, Principios, Procedimiento, Resultados y aplicaciones



6.8 Técnicas de bioloxía molecular

- Consisten na detección do ADN ou ARN viral.
- Teñen unha gran especificidade, sensibilidade e reproducibilidade, sen embargo non poden avaliar a viabilidade e infectividade do virus, para o que segue sendo necesario o illamento e cultivo.
- **PCR (reacción en cadea da polimerasa)**. Muy utilizada en calquera das súas variantes (PCR, PCR a tempo real, PCR anidada, PCR multiplex). Cando o virus é un virus ARN, a reacción de amplificación debe ir precedida dunha transcripción reversa para pasar o ARN a ADN.
- **Microarrays ou biochips**. Utilízanse sondas específicas inmovilizadas sobre unha superficie, que se incuba co material xenético a analizar. Teñen a vantaxe de que se poden inmovilizar sobre o soporte un elevado número de dianas que poden detectar diferentes virus nun mesmo ensaio. Moi útil na tipificación de virus gripais.

DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES VÍRICAS FRECUENTES

7.1 Virus da hepatitis

Trátase de diferentes virus que pertencen a diferentes familias. Todos son de simetría icosaédrica e todos son virus ARN, excepto o virus da hepatitis B que é un virus ADN.

Enfermedad	Virus	Familia	Diámetro aproximado	Ácido nucleico		Cápside	Cubierta externa
Hepatitis A	VHA	<i>Picornaviridae</i>	65 nm	ARN	Monocatenario positivo	Icosaédrica	No
Hepatitis B	VHB	<i>Hepadnaviridae</i>	42 nm	ADN	Parcialmente bicatenario	Icosaédrica	Sí
Hepatitis C	VHC	<i>Flaviviridae</i>	34 nm	ARN	Monocatenario positivo	Icosaédrica	Sí
Hepatitis D	VHD	<i>Deltaviridae</i>	36 nm	ARN	Monocatenario negativo	Icosaédrica	Sí*
Hepatitis E	VHE	<i>Hepeviridae</i>	27 nm	ARN	Monocatenario positivo	Icosaédrica	No

* Corresponde á envoltura do virus da hepatitis B (require da coinfección con este virus para o seu desenvolvemento)

DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES VÍRICAS FRECUENTES

7.1 Virus da hepatitis

○ Diagnóstico.

- Diagnóstico serolóxico: detección de anticorpos IgG e IgM.
- **A detección de IgM** indica que a infección é recente, pois estas inmunoglobulinas caracterízanse por ser de rápida aparición e curta duración.
- **A detección de IgG**, indica infección antiga. Aparecen antes dos primeiros síntomas e persisten por tempo indefinido. En ausencia de IgM indican que a persoa sufríu unha infección no pasado.

DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES VÍRICAS FRECUENTES

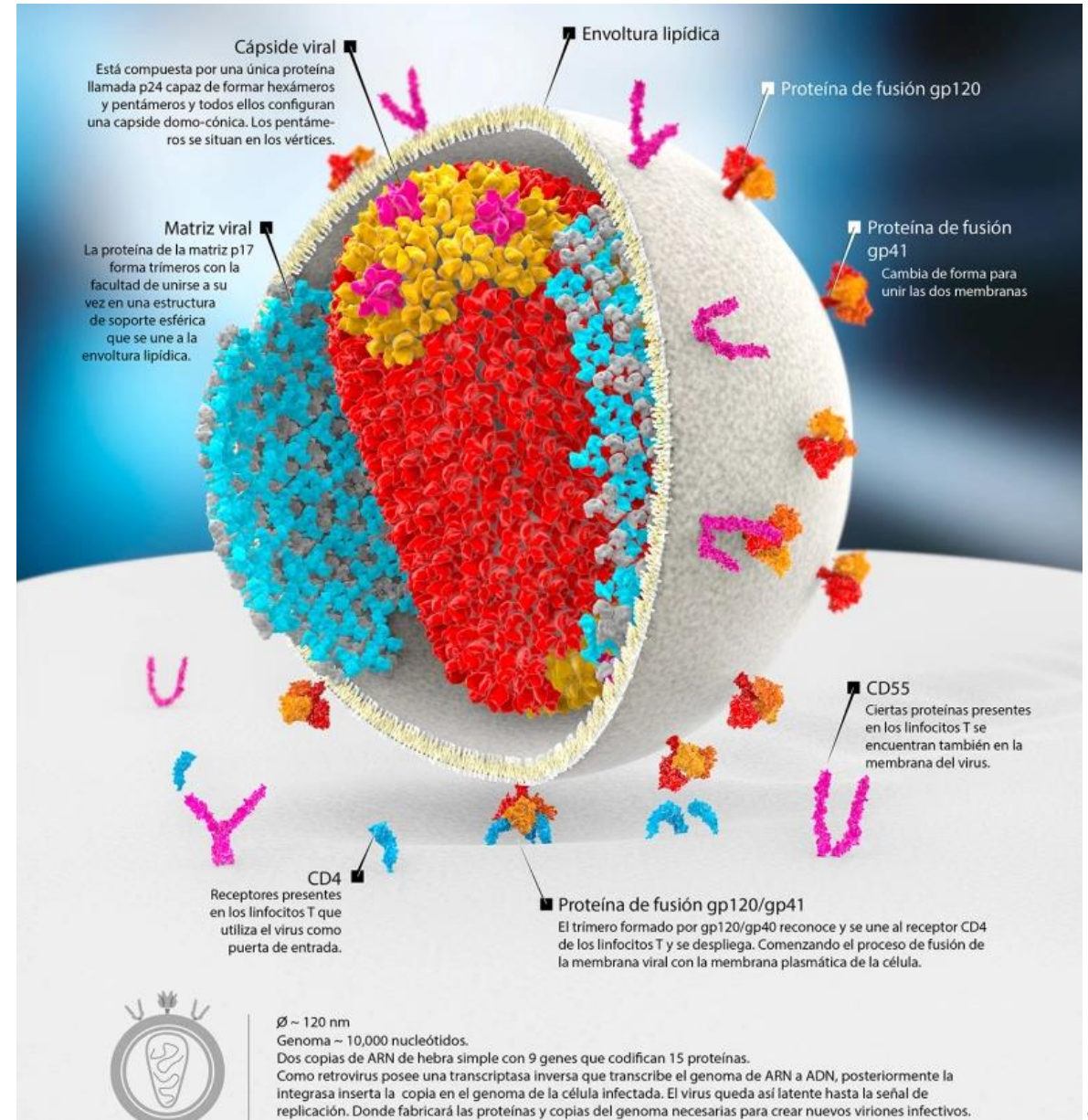
7.2 Virus do SIDA

- O virus da inmunodeficiencia humana (VIH) é un retrovirus, presenta gran diversidade xenética e un xenoma moi complexo.
- **Ciclo complexo**, con dúas fases: **virión infectante (ARN)** e **provirus (ADN)**. A fase de provirus, de integración no ADN da célula, permítelle prolongados periodos de tempo asintomáticos (de latencia) a pesar dunha viremia persistente.
- Replicase mediante unha **transcriptasa inversa (IT)**, mediante un mecanismo inverso ó habitual nos virus ARN.
- As células hóspede son os linfocitos CD4+, os macrófagos, células nerviosas da microglía e células dendríticas en mucosas (células de Langerhans).
- Existen dous tipos de VIH, o **VIH-1** e o **VIH-2**. O VIH-1 é o máis virulento e infeccioso, e o causante da maioría de infeccións por VIH. O VIH-2 é menos infeccioso e está confinado case exclusivamente en África occidental.

7.2 Virus do SIDA

○ Estrutura.

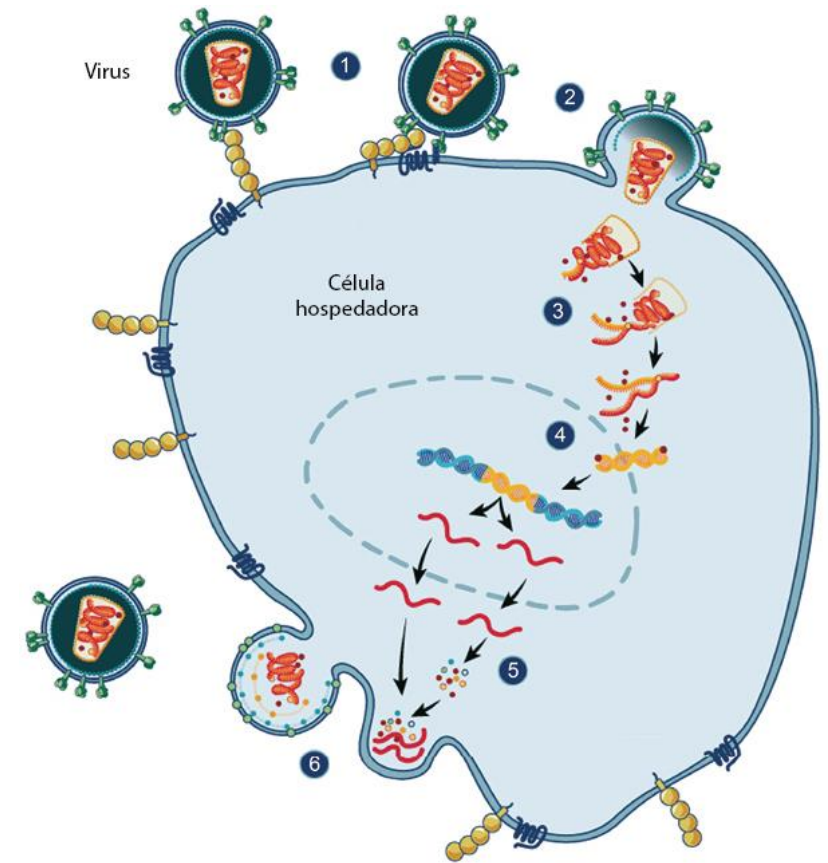
- **Envoltura externa:** bicapa lipídica con espículas formadas por glucoproteínas na súa cara externa (proteínas **gp120** e **gp41**).
- **Matriz viral:** formada pola proteína p17, protexe a cápside e únese á bicapa lipídica.
- **Cápside:** de simetría icosaédrica, formada pola proteína **p24**.
- **Núcleo:** consta de dúas moléculas de ARN monocatenario. Posee unha transcriptasa inversa que transcribe o ARN a ADN e unha integrasa que lle permite integrarse no ADN da célula hóspede.



7.2 Virus do SIDA

○ Ciclo infectivo.

1. **Acoplamento e fusión.** A envoltura externa do virión únese ós receptores da célula diana e activa proteínas que fan que as dúas membranas se fusionen. Tras a fusión o VIH libera o ARN no citoplasma da célula.
2. **Transcrición inversa.** Grazas a transcriptasa inversa o ARN pasa a ADN de dobre cadea, formando o ADN proviral ou provirus.
3. **Integración.** O ADN proviral penetra no núcleo e grazas ás integrasas, intégrase no ADN da célula.
4. **Transcrición e tradución.** Cando a célula sintetiza novas proteínas tamén sintetiza novas copias do VIH. O material xenético transcríbese a ARNm, que atravesa a membrana nuclear e diríxese ó citoplasma onde se traduce o ARNm e se forman longas cadeas de proteínas víricas.
5. **Ensamblaxe.** As cadeas de proteínas víricas divídense e ensámblanse para formar novas partículas víricas.
6. **Xemación.** O virus atravesa a membrana plasmática e leva parte desta que será a súa envoltura externa. O virión está preparado para infectar outras células.



Ciclo infectivo do VIH

7.2 Virus do SIDA

○ Diagnóstico.

A proba de confirmación máis rápida que hai a día de hoxe é a PCR. Non hai ningunha proba que permita o diagnóstico inmediato postinfección.

• Probas rápidas:

- Resultados en 30 minutos.
- Básanse na detección de anticorpos fronte ó VIH.
- Mostra utilizada: gota de sangue por punción capilar ou mostra de secreción bucal.
- Fiable despois do periodo de ventá, de 23 a 90 días postinfección.
- Necesita proba de confirmación (*Western blot*).

Tabla 3. Pruebas rápidas para la detección de anticuerpos frente al VIH.

Técnica	Antígeno
Dot-EIA 1ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 en un único <i>spot</i>
Dot-EIA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O" en " <i>spots</i> " diferenciados para VIH-1 y VIH-2
Látex/Aglutinación pasiva	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O"
Inmunocromatografía capilar	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1, VIH-2 y VIH-1"O"

7.2 Virus do SIDA

- Detección de antígeno-anticorpos:

- Básanse na detección de anticorpos fronte ó VIH (VIH-1 e VIH-2) pero tamén na detección do antígeno viral p24. Os antígenos pódense detectar antes que os anticorpos, e isto reduce o período de ventá para detectar a infección.
- Se a mostra é de sangue capilar o período de ventá está entre os 18 e os 90 días, se a mostra de sangue é venosa o período de ventá redúcese a 18-45 días.
- Necesita proba de confirmación (*Western blot*).

EIA: enzimoimmunoanálise.

ELFA: *enzyme-linked fluorescent assay*.

Tabla 2. Antígenos empleados en las pruebas de detección primaria de anticuerpos frente al VIH.

Técnica	Antígeno
EIA 1ª generación	Lisado viral VIH-1
EIA 2ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2
EIA/ELFA 3ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y antígeno VIH-1 del grupo O (<i>outlayer</i> o marginal)
EIA/ELFA 4ª generación	Péptidos recombinantes/sintéticos de VIH-1 y VIH-2 y VIH-1 "O", y anticuerpos para detectar el antígeno p24

Fonte: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/vihrev.pdf>

7.2 Virus do SIDA

- Probas de confirmación: *Western blot (WB)*
 - O WB é o estándar de confirmación da presenza de anticorpos fronte ó VIH.
 - O WB contén antíxenos do VIH, algunhas das súas proteínas precursoras e antíxenos de orixe celular. Existen sistemas de WB que incorporan nun extremo da tira un péptido sintético específico para VIH-2 (gp36).
 - Posto que o WB tamén incorpora proteínas da célula hóspede, podería darse reactividade con estas proteínas, por eso é necesario que a lectura do WB a faga unha persoa experimentada.

Tabla 4. Criterios de positividad de la prueba *western-blot*

Criterio	Reactividad frente a:
OMS	Dos glucoproteínas cualquiera de: gp160, gp120, gp41

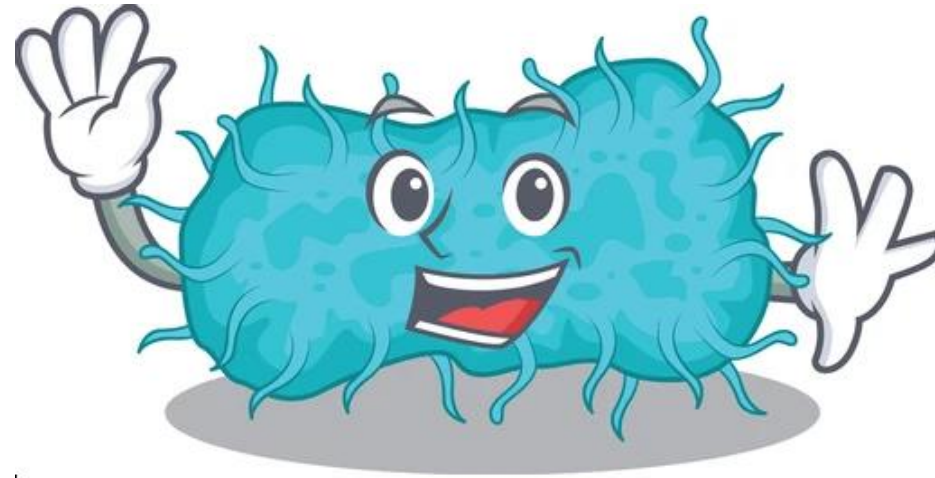
Fonte: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/vihrev.pdf>

7.3 Enfermidades emergentes

Dentro das enfermidades víricas emergentes atopamos:

- **Gripe aviar:** axente causal virus influenza H5N1 (familia *Orthomyxovirus*).
- **Febre hemorráxica de Marburgo:** axente causal virus de Marburgo (EVM) (familia *Filoviridae*).
- **Ébola:** axente causal Zaire-ébola-virus (EBOV) (familia *Filoviridae*).
- **Febre hemorráxica Crimeia-Congo:** axente causal virus da febre hemorráxica Crimeia-congo (Nairovirus, familia *Bunyaviridae*).
- **Covid-19:** axente causal SARS-CoV-2 (familia *Coronaviridae*).

E aquí rematamos.....



Foi un pracer :-)