

2. Diagnóstico de infecções virais

Alexandre dos Santos da Silva
Andreza Salvio Lemos
Arthur Daniel Rocha Alves
Bianca Cristina Leires Marques
Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro
Caroline Pereira Bittencourt Passaes
Debora Regina Lopes dos Santos
Diogo Gama Caetano
Eliane Veiga da Costa
Fernanda de Oliveira Bottino
Fernando Tavares
Flávia Freitas de Oliveira Bonfim
Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos

Jéssica Vasques Raposo Vedovi
Livia Melo Villar
Luciane Almeida Amado Leon
Lyana Rodrigues P. Lima Capobianco
Márcia Paschoal do Espírito Santo
Natália Spitz Toledo Dias
Nathália Alves Araujo de Almeida
Nathalia Beatriz Ramos de Sá
Renata Tourinho Santos Cantinho Bricio
Suwellen Sardinha Dias de Azevedo
Tatiana Prado
Tulio Machado Fumian
Vanessa Salete de Paula

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

SILVA, A. S., LEMOS, A. S., ALVES, A. D. R., MARQUES, B. C. L., RIBEIRO, C. R. A., PASSAES, C. P. B., SANTOS, D. R. L., CAETANO, D. G., COSTA, E. V., BOTTINO, F. O., TAVARES, F., BONFIM, F. F. O., VASCONCELOS, G. A. L. B. M., VEDOVI, J. V. R., VILLAR, L. M., LEON, L. A. A., CAPOBIANCO, L. R. P. L., SANTO, M. P. E., DIAS, N. S. T., ALMEIDA, N. A. A., SÁ, N. B. R., BRICIO, R. T. S. C., AZEVEDO, S. S. D., PRADO, T., FUMIAN, T. M. and PAULA, V. S. Diagnóstico de infecções virais. In: LEMOS, E. R. S., VILLAR, L. M., LEON, L. A. A., GUIMARÃES, M. L., TEIXEIRA, S. L. M., and PAULA, V. S., eds. *Tópicos em Virologia* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2023, pp. 47-86. BIO collection. ISBN: 978-65-5708-151-8. <https://doi.org/10.7476/9786557082119.0004>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Diagnóstico de Infecções Virais

Alexandre dos Santos da Silva • Andreza Salvio Lemos • Arthur Daniel Rocha Alves
• Bianca Cristina Leires Marques • Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro • Caroline
Pereira Bittencourt Passaes • Debora Regina Lopes dos Santos • Diogo Gama Caetano
• Eliane Veiga da Costa • Fernanda de Oliveira Bottino • Fernando Tavares • Flávia
Freitas de Oliveira Bonfim • Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos •
Jéssica Vasques Raposo Vedovi • Livia Melo Villar • Luciane Almeida Amado Leon •
Lyana Rodrigues P. Lima Capobianco • Márcia Paschoal do Espírito Santo • Natália
Spitz Toledo Dias • Nathália Alves Araujo de Almeida • Nathalia Beatriz Ramos de
Sá • Renata Tourinho Santos Cantinho Bricio • Suwellen Sardinha Dias de Azevedo •
Tatiana Prado • Tulio Machado Fumian • Vanessa Salete de Paula

O diagnóstico laboratorial das infecções virais é de fundamental importância para auxiliar na tomada de decisões dos profissionais da saúde quanto ao manejo do paciente, assim como em estudos de vigilância epidemiológica de diversas doenças. Neste capítulo, descrevem-se conceitos básicos do sistema e da resposta imunológica nas infecções virais, bem como metodologias de diagnóstico no campo da virologia, destacando suas aplicações, vantagens e limitações.

O Sistema Imune e as Bases da Imunidade

A resposta imune – responsável pela defesa e homeostase do organismo – é viabilizada pela interação entre moléculas e células do sistema imunológico. A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em inata e adaptativa. Por um lado, a imunidade inata representa um mecanismo de defesa conservado em diversos organismos multicelulares que responde imediatamente após o contato com patógenos, sendo caracterizada por uma resposta rápida e inespecífica, desencadeada por uma variedade

importante, mas limitada, de estímulos. É constituída de barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e componentes moleculares solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com patógenos.

A imunidade adaptativa, por outro lado, é estimulada após exposição a agentes infecciosos e aumenta em magnitude e eficiência a cada exposição sucessiva a um patógeno em particular. Por isso, essa resposta é marcada por uma alta especificidade e memória, mediada por células que expressam

Moléculas produzidas geralmente em resposta ao estímulo antigênico e que funcionam como um mensageiro químico para regulação do sistema imune adaptativo e inato.

receptores muito diversos, capazes de reconhecer muitos antígenos e mediadores químicos, como **citocinas**. Vale ressaltar que esses dois tipos de respostas constituem sistemas integrados baseados na cooperação. A resposta imune inata envia sinais precoces que estimulam as respostas imunes adaptativas, o que, por sua vez, mediante os mecanismos efetores da resposta

inata, aumenta sua eficiência.

A Resposta Imune nas Infecções Virais

Nas infecções virais, a primeira barreira contra a infecção é constituída pelas mucosas, uma vez que a maioria dos vírus infecta seus hospedeiros pelas vias aéreas, trato gastrointestinal e trato urogenital. Proteínas denominadas defensinas e ambientes altamente ácidos existentes nessas mucosas são os principais responsáveis pela eliminação do vírus nesse sítio de entrada. Porém, se o vírus for bem-sucedido e romper essa barreira inicial, células presentes na derme podem capturar o agente infeccioso e iniciar a resposta imune. O reconhecimento inicial de patógenos – nesse caso específico, os vírus – é feito por meio de um conjunto de receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês *pattern recognition receptors*) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (Pmaps) conservados associados a diversas classes de vírus.

A ativação dos PRRs promove a ativação de cascatas de sinalização intracelulares que culminam com a transcrição de genes estimulados por interferon (ISG, do inglês *interferon-simulated genes*), que atuam como

fatores diretos de restrição viral, além de genes envolvidos na resposta inflamatória. Dentre as principais funções realizadas pela ativação dos PRRs, destacam-se: a opsonização, a ativação do sistema complemento, a indução da fagocitose e da apoptose e a ativação de vias de sinalização de citocinas pró-inflamatórias, principalmente da via do interferon tipo I (IFN- α e IFN- β) e tipo III (IFN- λ 1, 2 e 3). Os interferons tipo I são um grupo de citocinas secretadas por todas as células nucleadas presentes em mamíferos, quando infectadas por vírus. Os IFN do tipo III estão limitados a células epiteliais e a um subconjunto de células imunes, desempenhando papel específico na proteção de superfícies mucosas.

Os interferons são conhecidos por apresentarem elevadas atividades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras, além de induzir a expressão de ISGs, estabelecendo assim um estado antiviral em células vizinhas não infectadas. Centenas desses ISGs exercem atividade antiviral direta, impedindo a entrada viral, a replicação e o brotamento em novas células. Essas citocinas induzem um estado antiviral e, uma vez secretadas em uma célula, as vizinhas começam a apresentar um estado de resistência à infecção viral por meio de diversos mecanismos. Um desses mecanismos é a inibição de genes virais por meio das enzimas Mx GTPases – proteína de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP) codificada pelo gene *MX1* –, gerando um estado não permissivo a novas infecções.

Ademais, os interferons tipo I podem ativar células *natural killer* (NK) e macrófagos que atuam na primeira linha de defesa contra infecções virais, constituindo elementos importantes da resposta imune inata. Macrófagos e NK são capazes de eliminar rapidamente células infectadas por meio de sua atividade citotóxica (células NK) e, no caso dos macrófagos, pela liberação de mediadores inflamatórios que induzem a proliferação e ativação de outras células do sistema imune. Já foi demonstrado que o Sars-CoV e Mers-CoV podem inibir a via do interferon por meio de algumas proteínas produzidas por esses vírus, como a ORF3b e ORF4a (do inglês *open reading frame*), respectivamente.

Além disso, citocinas produzidas pela ativação dos PRRs podem atuar na ativação da resposta imune adaptativa, recrutando células imunes para

o sítio da infecção e auxiliando a resposta antiviral. No entanto, apesar de a produção de citocinas ser imprescindível em uma resposta antiviral, existe um balanço entre proteção e patogênese relacionado a esses sensores: já foi documentada a associação entre a tempestade de citocinas e a severidade de sintomas na infecção pelo vírus influenza. Outra estratégia que muitos vírus possuem para evadir a resposta imune inata é a alta taxa de replicação. Em contrapartida, paralelamente à resposta inata, também ocorre a ativação da resposta adaptativa, principalmente através da ativação dos linfócitos B e T.

Os linfócitos B podem responder a uma infecção viral em diversas frentes, pela produção de anticorpos que vão atuar na neutralização do vírus, na ativação do sistema complemento, na opsonização e fagocitose e na citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC, sigla em inglês para *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Os linfócitos TCD8+ são um dos principais efetores em respostas antivirais por intermédio de sua

Compõem uma grande família de citocinas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração do sangue para os tecidos. São citocinas quimiotáticas que estimulam a produção de novas citocinas e auxiliam em diferenciações celulares.

atividade citotóxica, produzindo substâncias que vão promover a lise de células infectadas. Essas células podem, ainda, atuar na produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais estimularão outras células que participam da resposta imune de modo geral. A ativação dos linfócitos TCD4+, por sua vez, pode seguir diferentes caminhos efetores, dependendo dos fatores imunológicos presentes no sítio da infecção, como citocinas, **quimiocinas** e hormônios.

Resposta executada por linfócitos T que produzem citocinas necessárias para uma resposta efetora eficiente contra patógenos intracelulares, tais como os vírus.

Podemos definir a resposta efetora de células TCD4 em Th1 e Th2; essas populações são assim definidas com base nas citocinas que produzem. A **resposta Th1** está relacionada com a resposta celular, ao passo que a Th2 atua na resposta humoral. A maioria das infecções virais induz a produção de interferons e, por conseguinte, há uma preferência para a ativação da resposta do tipo Th1. Porém, em alguns casos,

podem ocorrer respostas mistas, como no caso do vírus da rubéola, que induz uma resposta do padrão Th1 no início da infecção e, já na fase final da doença, essa resposta muda para o padrão Th2. Tais linfócitos T com perfil Th2 podem regular a resposta antiviral por meio da ativação de linfócitos B para produção de anticorpos contra o vírus.

A Vacinação e o Treino da Imunidade

No conjunto, tais mecanismos utilizados pelo sistema imune para impedir a infecção de patógenos são os responsáveis pelo desenvolvimento da imunidade. Essa imunidade, por sua vez, pode ser: natural, conferindo proteção inespecífica mediante a ação dos componentes do sistema imune inato e das barreiras físicas como o epitélio e a microbiota; ou adquirida, garantindo resposta imune eficiente a longo prazo e, em caso de infecções repetitivas, por meio da ação do sistema imune adaptativo.

Nas infecções virais, os mecanismos de imunidade são responsáveis por diversas frentes que tentam impedir a replicação viral e a manutenção da infecção. Na resposta imune inata, a principal estratégia é o reconhecimento de padrões moleculares comuns aos vírus pelas células imunes inatas que, então, ativam seus mecanismos efetores; um exemplo é a degradação de células infectadas realizada pelas células NK. Já na resposta imune adaptativa, ocorre a produção de anticorpos e a proliferação de células específicas capazes de impedir a disseminação viral.

Em virtude de sua capacidade de memória de longo prazo e especificidade, a resposta imune adaptativa é a principal responsável pelo efeito das vacinas. O processo pode consistir em estimular a ação e a montagem da resposta de linfócitos B e T por meio da exposição do organismo a antígenos, caracterizando a imunidade ativa, ou em aplicar diretamente anticorpos específicos para o patógeno contra o qual se deseja vacinar, caracterizando a imunização passiva. Para agentes virais, a imunização ativa pode ser alcançada tanto por inoculação de antígenos de interesse como por inoculação direta de variantes virais.

Nas estratégias de vacinação baseadas em uso de variantes virais, as vacinas podem ser caracterizadas como atenuadas ou inativadas. As atenuadas são compostas de micro-organismos que têm sua patogenicidade atenuada em laboratório, mas mantêm sua capacidade de indução da imunidade específica de anticorpos visando à estimulação da resposta imune (exemplos: vacinas contra sarampo, rubéola, caxumba e varicela). As vacinas inativadas, por sua vez, são compostas de micro-organismos inativados por compostos químicos, como o formaldeído, ou por partí-

culas virais que não apresentam potencial de produzir doença (exemplos: vacinas contra hepatite A, hepatite B, influenza e papilomavírus humano). Apesar de ambos os tipos de vacinas, inativadas e atenuadas, poderem utilizar diretamente os vírus, as inativadas são ainda caracterizadas pela necessidade de adjuvantes e por produzirem pouca ou nenhuma resposta celular, sendo basicamente indutoras da resposta humoral.

Apesar de tais estratégias serem eficientes na indução de imunidade para a grande maioria dos casos, os vírus apresentam exacerbada capacidade de evadir o sistema imune. Alguns desses vírus desenvolveram estratégias de persistência no enfrentamento a componentes imunológicos e permitem o escape da resposta imune. Essas estratégias também atrapalham o desenvolvimento de novas vacinas, criando diversos obstáculos. Em alguns casos, como o do HIV, o alto potencial de variabilidade genética das proteínas virais é uma barreira importante para o desenvolvimento de uma vacina preventiva com eficácia ampla e duradoura. Em outros casos, como o do vírus influenza, a alta variabilidade demanda que a vacina tenha periodicidade anual e necessite de atualização constante, com base nos antígenos das novas cepas virais circulantes. Por fim, a capacidade de recuperação de patogenicidade em vacinas atenuadas limita a aplicação dessa estratégia para diversos vírus que causam infecções crônicas e agudas.

Uma estratégia eficiente para impedir a reversão de virulência e, que vem sendo utilizada nos últimos anos, é o emprego de vacinas recombinantes. Nesse tipo de imunização, proteínas do patógeno são produzidas em células de bactérias, leveduras, insetos, mamíferos ou plantas, por meio da tecnologia recombinante de DNA, sendo posteriormente purificadas para inoculação em indivíduos saudáveis.

Diferentemente das vacinas atenuadas e inativadas, que podem, respectivamente, reverter a virulência, causando infecção pelo patógeno ou não gerarem a resposta imune completa, as vacinas recombinantes são consideradas mais seguras e eficazes, uma vez que não comportam o material genético do patógeno. Vacinas contra diversos vírus estão sendo modificadas com a finalidade de utilizar a metodologia das vacinas recombinantes; entre elas estão as vacinas da hepatite B, que têm como alvo o

antígeno HBsAg, as vacinas utilizadas por veterinários – como circovírus suíno tipo 2 – e, mais recentemente, a vacina recombinante contra o papilomavírus humano.

Diagnóstico Clássico das Infecções Virais

Cultura celular

O isolamento viral em sistemas vivos, como as culturas celulares, é considerado o padrão-ouro no diagnóstico das infecções virais. Com o cultivo viral em células, além do isolamento e propagação do vírus, é possível também observar os efeitos da infecção viral nas células. Além disso, a produção de vírus em cultura de células não só contribui para o diagnóstico direto, mas também tem sido usada como ferramenta para o desenvolvimento de vacinas, por exemplo, contra a poliomielite, a hepatite A, o sarampo e a rubéola, permitindo que essas doenças tenham sido controladas, e até eliminadas, em grandes áreas.

Os cultivos celulares são classificados de acordo com o tipo de célula usada, podendo ser: cultura de célula primária (preparada com base em tecidos frescos, recém-obtidos por desagregação mecânica ou enzimática do tecido), cultura de células diploides (estabelecida por meio do subcultivo de células primárias) ou cultura de célula contínua (derivada de tumores).

Evidência do crescimento viral

Durante a replicação, alguns vírus têm a capacidade de alterar morfológicamente ou destruir a célula hospedeira e infectar uma nova célula. As alterações visíveis são chamadas de efeito citopático, ou citopatogênico (CPE, sigla em inglês para *cythopathic effect*), e podem ser percebidas com um simples microscópio óptico ou de contraste de fase. Em geral, determinados grupos de vírus produzem um tipo de CPE característico e, para que esse efeito seja observado, a célula cultivada deve ser suscetível à infecção viral suspeita. São exemplos comuns de CPE: a formação de **sincícios**

Célula que contém muitos núcleos originada por fusão de células uninucleadas ou por muitas divisões celulares incompletas.

Retração e adensamento do núcleo, com perda da individualidade dos grânulos de cromatina.

(alguns herpesvírus e paramixovírus), a **picnose nuclear** (entovírus), o arredondamento celular (poliovírus e herpesvírus) e os corpúsculos de inclusão (rabdovírus).

A identificação de um determinado CPE sugere o sucesso do isolamento viral, mas como um mesmo efeito pode ser apresentado por mais de um tipo de vírus, é importante confirmar a identidade do vírus isolado por métodos imunológicos ou moleculares. Em caso de resultado negativo no primeiro subcultivo, segunda e terceira passagens devem ser realizadas; somente se considera negativa uma amostra quando o resultado se mantiver negativo em todas as passagens.

Titulação viral

A titulação viral consiste na quantificação de uma suspensão viral e tem como objetivo a determinação da carga viral. Os três principais métodos de titulação consistem no ensaio de placas, na diluição-limite e na reação em cadeia da polimerase (PCR, sigla em inglês para *polymerase chain reaction*) em tempo real (qPCR).

No ensaio de placas, adequado para vírus citolíticos, observam-se as células mortas com o auxílio de um corante, uma vez que, durante uma infecção viral, o vírus replica-se na célula e é transmitido às células vizinhas, provocando sua morte. Após a inoculação viral em um sistema de cultura em meio contendo agarose, o corante (cristal violeta) é adicionado para observação de células vivas. Dessa forma, quanto mais corado o poço, menor a carga viral. A concentração de partículas virais, determinada pelo número de unidades formadoras de placas (PFU, sigla em inglês para *plaque forming units*) por mililitro, pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

Concentração viral = número total de placas virais / volume usado x fator de diluição

O método da diluição-limite detecta as células vivas de uma cultura de células suscetíveis infectadas pelo vírus de interesse. Calcula-se a diluição que gera a infecção em 50% das culturas inoculadas (TCID₅₀, sigla do inglês *tissue culture infectious dose* ou dose infectante 50%). Uma tabela

deve ser construída contendo o número de culturas infectadas e não infectadas para cada diluição e os totais acumulados de culturas infectadas e não infectadas para uma das diluições. Esse método é mais complexo, mas, como vantagem, pode ser utilizado para diagnóstico de vírus que não induzem a morte celular.

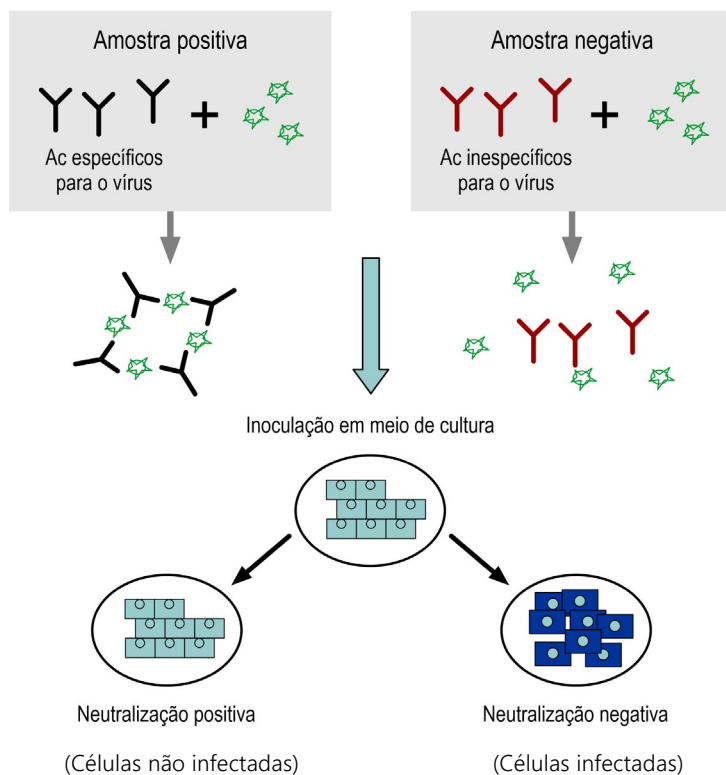
Diagnóstico Sorológico das Infecções Virais

O diagnóstico sorológico das infecções virais baseia-se na identificação de anticorpos específicos produzidos em resposta a uma infecção viral. As técnicas mais comumente utilizadas no diagnóstico sorológico são as descritas a seguir.

Teste de neutralização

O teste de neutralização é baseado no princípio de que o vírus, quando interage com anticorpos específicos, é neutralizado – perdendo, então, a capacidade de infectar células permissivas. Além disso, determina-se a diluição máxima na qual o anticorpo específico contra determinado antígeno consegue inibir a replicação viral em cultura celular, ovos embrionados ou animais. Desse modo, o teste de neutralização pode ser usado tanto para a identificação de vírus quanto para avaliação do nível de anticorpos específicos (Figura 1).

Figura 1 – Esquema do teste de neutralização



Em uma amostra *positiva* existem anticorpos específicos para o vírus que o neutralizam, mas tais anticorpos estão ausentes nas amostras *negativas*. Após inoculação em meio de cultura, a reação de neutralização é considerada positiva quando o antígeno (o vírus) presente na amostra é neutralizado por anticorpos específicos; ele perde, portanto, a capacidade de infectar células permissivas.

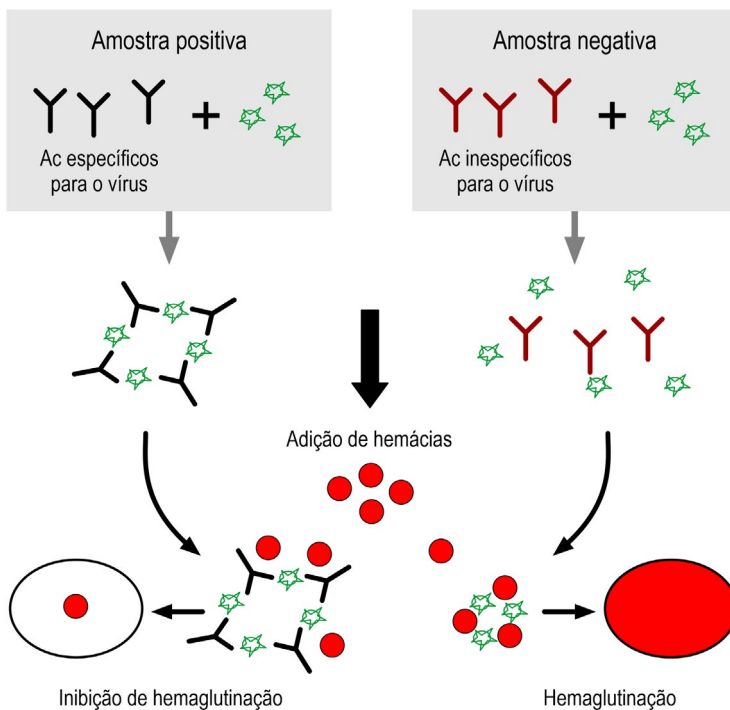
Para a detecção de anticorpos, uma suspensão de um vírus conhecido é misturada ao soro do paciente que contém os anticorpos de especificidade desconhecida. Esse método detecta anticorpos totais – imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) –, sem discriminar a classe da imunoglobulina. Por conta disso, o diagnóstico de uma infecção recente utilizando esse método para pesquisa de anticorpos somente pode ser realizado pela demonstração da conversão sorológica ou soroconversão. Nesse caso,

testam-se simultaneamente as duas amostras de soro do paciente: soro da fase aguda e soro da fase convalescente; diluições seriadas dos soros são empregadas para determinação do título de anticorpos.

Teste de inibição da hemaglutinação

Este teste baseia-se na capacidade de determinados vírus de aglutinar eritrócitos de aves ou mamíferos. Os anticorpos específicos, ao ligarem-se às proteínas virais responsáveis pela hemaglutinação, inibem a ligação do vírus ao eritrócito. Sem essa ligação o eritrócito não é aglutinado, o que demonstra a presença do vírus (Figura 2).

Figura 2 – Esquema de um teste de inibição da hemaglutinação



No esquema, é possível observar que amostras *positivas* apresentam anticorpos específicos para o vírus. Quando hemácias são adicionadas ao teste, os vírus, que estão ligados aos anticorpos específicos, não hema-

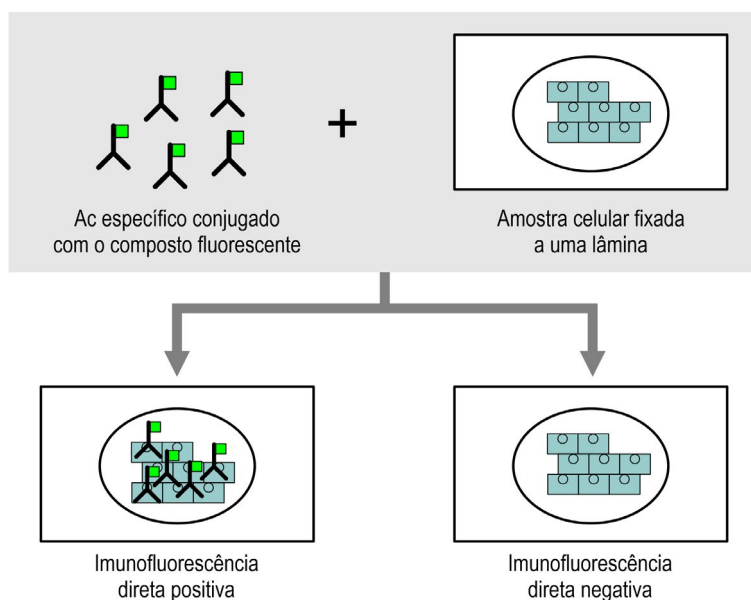
glutinam e as hemácias deslocam-se para o fundo, criando um *botão de hemácias*. Quando a amostra é *negativa*, essa inibição de hemaglutinação não ocorre e existe uma espécie de *tapete* formado por vírus e hemácias.

Imunofluorescência

Esta técnica baseia-se no uso de anticorpos marcados com corantes fluorescentes (fluoresceína, rodamina, *Texas Red*), que são empregados na pesquisa de vírus específicos. Os imunocomplexos vírus-anticorpos marcados são visualizados pela imunofluorescência no microscópio de fluorescência. Quando excitado pela luz ultravioleta emitida pelo microscópio, o corante fluorescente emite uma luz no comprimento de onda curto, visível à microscopia. A cor emitida é determinada pelo tipo de corante empregado. A imunofluorescência pode ser realizada pela técnica direta ou indireta.

A imunofluorescência direta é bastante utilizada na identificação de antígenos virais e baseia-se na adição de anticorpos ligados a compostos fluorescentes à amostra em estudo, sendo comum o seu emprego em células ou tecidos (Figura 3).

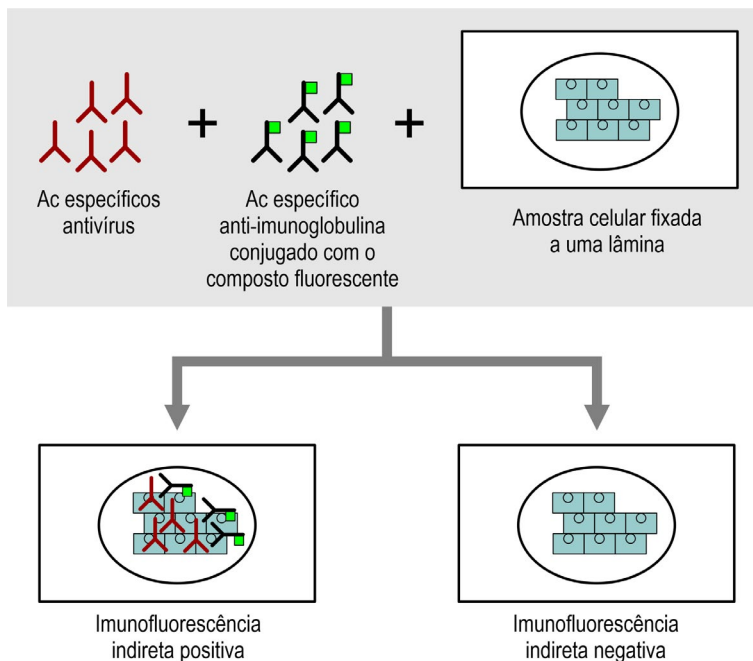
Figura 3 – Esquema de imunofluorescência direta



A reação de imunofluorescência direta é considerada positiva quando observada uma fluorescência evidente ao microscópio, como resultado da ligação do anticorpo específico que está diretamente conjugado ao composto fluorescente.

A imunofluorescência indireta é empregada em laboratórios de virologia para a detecção de antígeno ou anticorpos. Essa técnica é realizada em duas etapas: na primeira, anticorpos não marcados e específicos ao vírus são adicionados às células infectadas, fixadas a uma lâmina de microscópio; essa amostra é incubada e lavada. Na segunda etapa, adiciona-se anticorpo anti-imunoglobulina conjugado com o composto fluorescente (Figura 4).

Figura 4 – Esquema de imunofluorescência indireta



A reação de imunofluorescência indireta é considerada positiva quando observada uma fluorescência evidente ao microscópio, como resultado da ligação do anticorpo anti-imunoglobulina, conjugado com o composto fluorescente, ao anticorpo primário, específico.

Teste imunoenzimático

Os testes imunoenzimáticos – Elisa (sigla do inglês para *enzyme linked immunosorbent assay*) – baseiam-se no emprego de anticorpos conjugados a enzimas e na sua utilização para a detecção de antígenos ou anticorpos. A reação é revelada pela adição do substrato em solução cromogênica. O primeiro componente da reação (antígeno ou anticorpo) é fixado a uma fase sólida (exemplo: placa de poliestireno), seguindo-se a adição da amostra teste para formação do imunocomplexo.

Tipo de resina termoplástica polimerizada por meio do estireno (vinil benzeno).

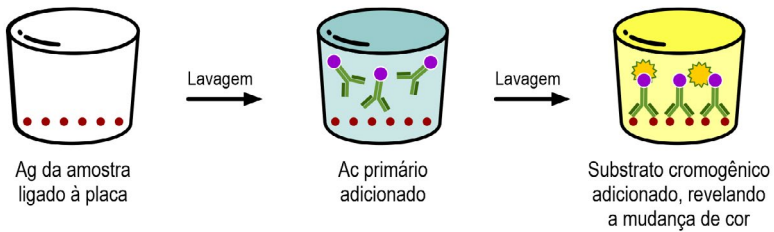
Após incubação e lavagem da fase sólida (placa, fita ou cassete), o conjugado é adicionado. Após nova incubação e lavagem, a reação é revelada pela adição do substrato específico da enzima empregada, associado a um cromógeno. Essa adição final resulta na mudança de coloração, cuja quantificação é feita pela medida da densidade óptica da solução em espectrofotômetro, ou pela intensidade de cor visual. Existem quatro tipos de ensaio imunoenzimático: direto, indireto, sanduíche (ou de captura) e competitivo.

Direto

É indicado para identificação de antígenos. Corresponde ao procedimento básico do Elisa, pois não utiliza anticorpos de captura ou alvos de competição. A amostra que contém o antígeno a ser detectado é adicionada ao suporte e, após incubação e uma lavagem para retirada dos componentes não fixados, adiciona-se um conjugado enzimático (anticorpo ligado à enzima). Por fim, acrescenta-se o substrato cromogênico. Se a amostra contiver o antígeno, ele se liga ao anticorpo conjugado à enzima e desenvolve cor proporcional à quantidade de antígeno na amostra (Figura 5).

Que produz pigmento ou cor.

Figura 5 – Esquema de um ensaio de Elisa direto



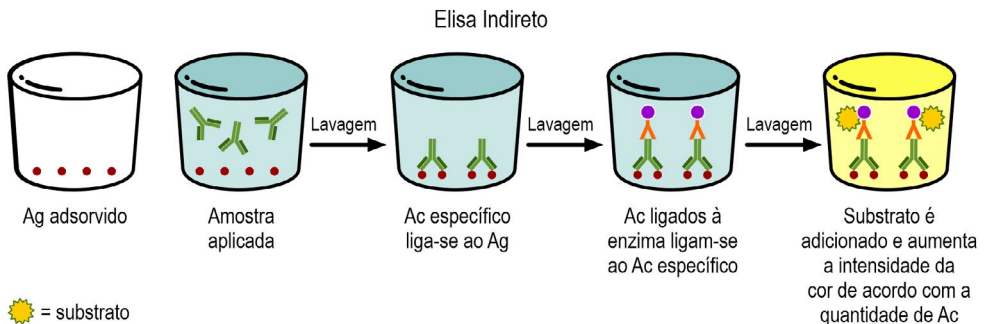
= substrato

Em uma placa de Elisa direto, o antígeno/alvo está ligado à placa e um anticorpo primário (conjugado enzimático) é colocado diretamente sobre o alvo. O teste é revelado pela adição do substrato cromogênico. Se a amostra for positiva, a intensidade de cor aumenta à medida que a quantidade de antígeno se eleva.

Indireto

Detecta a presença de anticorpos. Nesse caso, a amostra de soro, contendo anticorpos cuja presença se quer verificar, é incubada com o suporte sólido que contém o antígeno previamente fixado (Figura 6). Após a lavagem para retirada dos componentes não fixados, um anticorpo anti-imunoglobulina marcado com uma enzima (conjugado) é adicionado. O conjugado fixa-se ao complexo antígeno-anticorpo da fase sólida. Uma nova etapa de lavagem é realizada para retirada do conjugado não ligado, seguida da adição do substrato cromogênico que resultará na produção de reação colorida, de intensidade proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra (Figura 6).

Figura 6 – Esquema de um ensaio de Elisa indireto



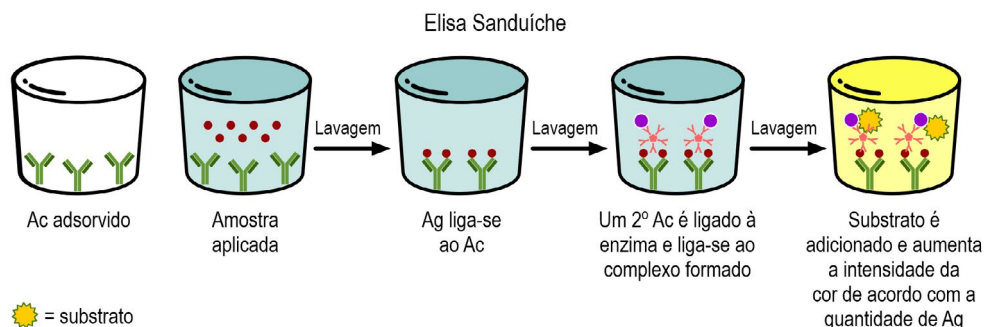
= substrato

Em uma placa de Elisa indireto contendo antígenos adsorvidos, aplicam-se as amostras de soro a serem testadas. Se as amostras forem positivas, os anticorpos presentes se ligam a esses antígenos adsorvidos. Em seguida, adiciona-se um conjugado que consiste em anticorpo ligado a uma enzima, capaz de reconhecer anticorpos da amostra. Essa enzima reage com o substrato adicionado em seguida, provocando mudança na intensidade de cor, à medida que a quantidade de antígeno aumentar na amostra.

Sanduíche (ou de captura)

É indicado para identificação de antígenos. O Elisa sanduíche é chamado assim pois o antígeno, cuja presença se pretende verificar, fica entre dois anticorpos, o de captura e o de detecção. Nesse método, os anticorpos de captura são ligados ao suporte sólido da placa. A seguir, é adicionada a amostra contendo o antígeno, que se liga aos anticorpos de captura. Após a lavagem para retirada de antígenos que não se ligaram aos anticorpos de captura, adicionam-se anticorpos conjugados à enzima, que fazem o reconhecimento da presença do antígeno. Uma nova etapa de lavagem é realizada para a retirada dos anticorpos conjugados que não se ligaram à amostra e, por fim, adiciona-se o substrato que reage com a enzima, promovendo mudança de cor (Figura 7). Como essa técnica utiliza anticorpos de captura, há um aumento da especificidade da ligação com a amostra.

Figura 7 – Esquema de um ensaio de Elisa sanduíche

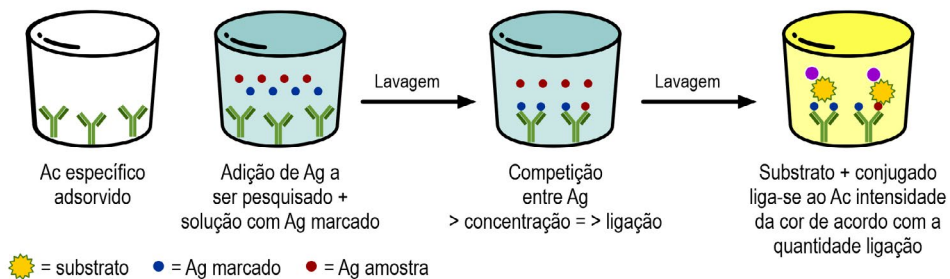


Na placa de Elisa sanduíche, são adsorvidos anticorpos específicos para o vírus que está sendo pesquisado. Em seguida, amostras são aplicadas aos poços e, se forem positivas, os vírus presentes se ligam a esses anticorpos adsorvidos. Um conjugado (anticorpo específico contra o antígeno ligado a uma enzima) é adicionado e se liga ao complexo formado (anticorpo adsorvido + antígenos da amostra). A enzima acoplada ao anticorpo reage com o substrato cromogênico adicionado, resultando em mudança de cor, cuja intensidade é proporcional à quantidade de antígeno na amostra.

Competitivo

É mais usado para identificação de antígenos, mas pode também ser empregado para a detecção de anticorpos. Nesse método, primeiro se adsorve o anticorpo no poço da microplaca. A amostra a ser testada (contendo o antígeno), juntamente com o conjugado (antígeno marcado com enzima), são simultaneamente incubados em cada cavidade. Se a amostra apresentar o antígeno específico, ele compete com o conjugado para unir-se na fase sólida. Dessa forma, após a adição do substrato enzimático e do cromógeno, as amostras positivas (contendo o antígeno) são incolores e as negativas apresentam cor (Figura 8).

Figura 8 – Esquema de um ensaio de Elisa competitivo



Em uma placa de Elisa competitivo são adsorvidos anticorpos específicos ao vírus que está sendo pesquisado. Em seguida, são aplicados ao poço a amostra a ser pesquisada e os antígenos marcados, ou seja, contendo a enzima. Quanto maior a quantidade de antígenos da amostra, maior é

sua ligação aos anticorpos adsorvidos, proporcionalmente aos antígenos marcados. E quanto menor a quantidade de antígenos marcados ligados aos anticorpos adsorvidos, menos intensa a produção de cor, depois da adição de substrato. Portanto, se a amostra for muito positiva, não há quantidade suficiente de antígenos marcados para reagir com o substrato e o poço permanece incolor. Em uma amostra *negativa*, só há antígenos marcados ligados aos anticorpos adsorvidos e a intensidade de cor será máxima nesse poço.

Imunoblotting

Neste ensaio são utilizados anticorpos ou antígenos ligados a uma fase sólida, específicos contra anticorpos presentes na amostra (IgM ou IgG). Geralmente se utiliza, como fase sólida, um suporte em forma de pente contendo, em cada dente, o antígeno ou o anticorpo (Figura 9). Os antígenos ou anticorpos contidos na amostra são, então, capturados pelos anticorpos ou antígenos imobilizados na fase sólida e revelados pela adição de antígenos ou anticorpos conjugados à enzima e específicos contra o material da amostra.

Um exemplo é o teste de *imunoblotting* para o diagnóstico de anticorpos específicos para a proteína de superfície do vírus da hepatite B (HBs). No ensaio, antígenos de HBs contidos na fase sólida ligam-se a anticorpos IgG e IgM específicos contra o vírus da hepatite B na amostra. Os anticorpos que não se ligam são lavados e retirados na fase seguinte. Após a remoção desses anticorpos inespecíficos, adiciona-se antígeno HBs, conjugado com enzima reveladora. Após esse passo, junta-se o substrato que revela, por meio da coloração da amostra, a presença de anticorpos específicos.

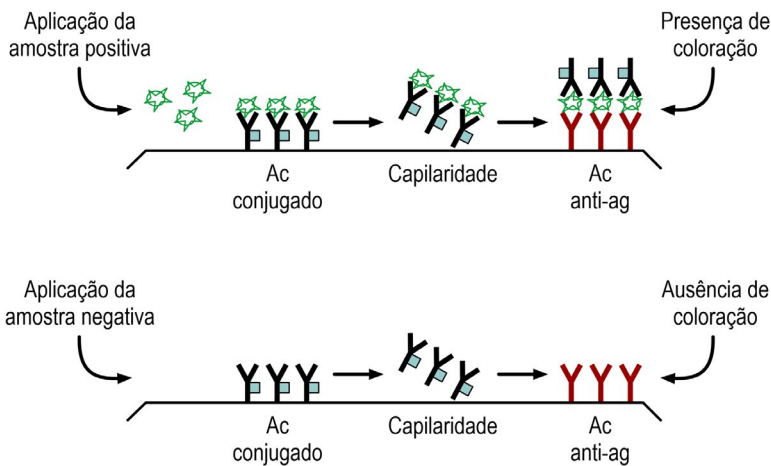
Figura 9 – Teste comercial de *imunoblotting*



Teste rápido (imunocromatografia)

Baseia-se na migração de antígenos ou anticorpos contidos na amostra, por cromatografia, ao longo de um suporte sólido (membrana de nitrocelulose) (Figura 10). O antígeno ou o anticorpo é fixado na membrana sob a forma de linhas ou pontos. Para detecção de antígenos, podem ser utilizados anticorpos fixados na membrana e um segundo anticorpo conjugado a um corante. Nesse caso, o antígeno contido na amostra se liga a anticorpos específicos conjugados a um corante insolúvel – como ouro coloidal (róseo) ou prata coloidal (azul marinho) – e, após a migração por cromatografia, a formação do imunocomplexo (antígeno-anticorpo) é revelada pelo depósito do corante coloidal na linha de captura. Os testes rápidos permitem a obtenção do resultado em um curto espaço de tempo e, por apresentarem um bom desempenho e constituírem uma metodologia de fácil aplicação, têm sido amplamente empregados no diagnóstico de diversas infecções virais, como a infecção pelo HIV e as hepatites virais, por exemplo.

Figura 10 – Esquema de um teste rápido (imunocromatografia) para detecção de antígenos



A amostra é aplicada em um suporte sólido (membrana de nitrocelulose). Os vírus presentes na amostra pesquisada migram na membrana

de nitrocelulose por capilaridade, até se ligarem a anticorpos específicos que estão conjugados. Esse complexo antígeno + anticorpo continua migrando pela membrana até encontrar anticorpos antiantígeno fixados na membrana de nitrocelulose e desencadear a coloração na faixa do teste. Do contrário, se a amostra for negativa, essas ligações de antígeno e anticorpo não acontecem e o teste não apresenta coloração.

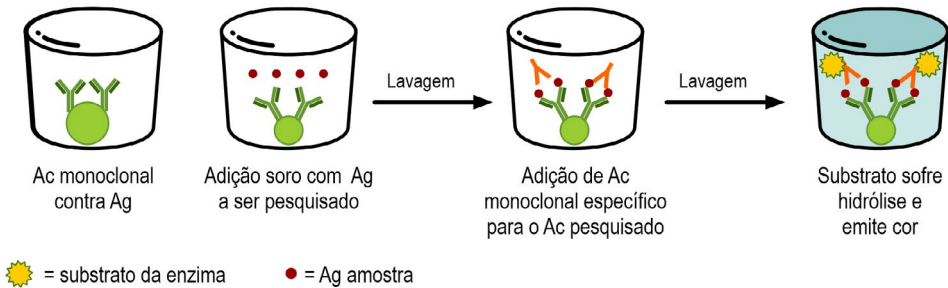
Testes automatizados por quimioluminescência

Trata-se de um método imunológico baseado na emissão de energia luminosa por meio de uma reação química. A técnica baseia-se na ligação de antígenos ou anticorpos, presentes em fluidos corporais ou soro, a microesferas revestidas com anticorpo monoclonal ou antígeno. Um dos dois reagentes é conjugado a uma substância que, quando ativada, emite luz visível. A emissão de luz é proporcional à quantidade do reagente pesquisado (Figura 11).

Basicamente, nesse método, uma microesfera de poliestireno é revestida com anticorpo monoclonal contra o antígeno analisado. Após a adição e a incubação da amostra, ocorre a lavagem para retirada do antígeno não fixado. A seguir, adiciona-se o conjugado (anticorpo monoclonal específico para o antígeno marcado com enzima). Após a incubação do conjugado e uma nova lavagem para retirar o anticorpo não fixado, adiciona-se o substrato da enzima. O substrato quimioluminescente sofre **hidrólise** na presença da enzima, produzindo substâncias instáveis que geram emissão de fótons (luz). Esses fótons são medidos através de um fotomultiplicador com a função de transformar a luz emitida em impulsos elétricos, que são lidos em contagens por segundo (cps) de luz. Essa unidade é proporcional à quantidade de antígenos presentes na amostra.

Reação química na qual uma molécula de água quebra uma ou mais ligações químicas.

Figura 11 – Esquema do teste automatizado por quimioluminescência



Em microesferas de poliestireno, são adsorvidos anticorpos monoclonais contra os antígenos pesquisados. Em seguida, a amostra é adicionada ao meio e, se for positiva, carrega os antígenos que estão sendo pesquisados. Um anticorpo direcionado contra o antígeno sendo pesquisado, conjugado a uma enzima, é adicionado ao meio, assim como o substrato da enzima. A hidrólise do substrato, promovida pela enzima, resulta em emissão de cor, revelando a positividade da amostra.

Diagnóstico Molecular das Infecções Virais

As técnicas moleculares de detecção viral são bastante utilizadas no diagnóstico e vêm substituindo métodos convencionais, como a propagação do vírus em cultura celular. O diagnóstico molecular de uma infecção viral baseia-se em detectar o material genético do vírus em amostra clínica, como soro, sangue total, fezes, tecidos, saliva etc. Quando comparadas às demais metodologias aplicadas ao diagnóstico viral, as técnicas moleculares apresentam diversas vantagens, dentre as quais destacam-se: detecção viral precoce; alta sensibilidade e especificidade para revelar baixas concentrações de vírus presentes em uma amostra; detecção de vírus que não podem ser identificados por meio de cultivo celular; e alta capacidade de diferenciação de gênero, espécie e genótipo viral, com base na utilização de ferramentas para tipagem e caracterização viral. Atualmente, os testes moleculares têm diversas aplicações tanto no diagnóstico das infecções virais como no âmbito da pesquisa científica, na rotina clínica de hospitais e bancos de sangue.

A seguir, abordam-se as principais técnicas de biologia molecular utilizadas no diagnóstico e estudo de infecções virais.

PCR

A PCR é, atualmente, uma das técnicas mais comumente utilizadas em laboratórios de pesquisa para o diagnóstico. Esse método emprega os fundamentos da replicação enzimática do DNA, utilizando uma enzima

DNA polimerase termoestável. Permite a amplificação, *in vitro*, de uma sequência específica de DNA, aumentando exponencialmente o número de cópias do fragmento-alvo. A fim de replicar *in vitro* o DNA, determinados reagentes são necessários

Fora do organismo vivo.
Expressão do latim que significa em vidro em português.

para compor a reação de PCR. São eles:

- Enzima DNA polimerase: é uma enzima DNA-polimerase, DNA-dependente, termoestável, que sintetiza o DNA no sentido 5' → 3', utilizando o Mg^{2+} como cofator. Durante a reação, promove o aumento do número de cópias do DNA molde ao replicar o DNA.
- Oligonucleotídeos, ou iniciadores, ou *primers*: são curtas sequências de DNA sintético, contendo aproximadamente 15 a vinte nucleotídeos, que são complementares às regiões altamente conservadas do genoma de interesse. Devem ser compostos de 40% a 60% de bases guanina e citosina e não devem ter sequências complementares entre si, ou demais iniciadores utilizados na reação. Geralmente, na reação, utilizam-se no mínimo dois iniciadores – o senso e o antissenso, que se hibridizam no genoma viral na região de interesse para amplificação, determinando o tamanho do fragmento a ser replicado.
- Desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs): são usados pela enzima polimerase na síntese das novas fitas de DNA com base na fita molde. Consistem em compostos de quatro bases nitrogenadas: timina, citosina, adenina e guanina. Durante a síntese da nova fita, a base complementar àquela que compõe a fita molde é adicionada à sua extremidade 3', liberando fosfato como produto dessa reação de adição de nucleotídeo.

- Cloreto de magnésio ($MgCl_2$): a presença de Mg^{2+} é essencial para a reação, atuando como cofator da polimerase. Esse íon influencia a desnaturação do DNA e promove maior estabilidade na ligação entre o DNA molde, o iniciador e a enzima, aumentando o rendimento da reação e reduzindo o número de erros inseridos no produto sintetizado pela enzima.
- Solução tampão: confere o ambiente ideal em que a reação deve ocorrer, pois regula o pH ao seu potencial ótimo de 8,3 – requerido para a função enzimática da DNA polimerase. A composição do tampão é variável de acordo com a enzima utilizada, mas todos contêm o composto Tris-HCl (hidroximetil aminometano) e sais.
- Íons cátions: o Na^+ ou K^+ estão presentes nas soluções-tampão utilizadas na PCR e são requeridos para diminuir a repulsão entre as moléculas de DNA e os iniciadores.
- Água: deve ser livre de enzimas DNases e RNases (capazes de degradar DNA e RNA). É utilizada para ajustar a concentração final dos componentes da reação, além de completar o volume final da reação.
- Ácido nucleico: DNA ou cDNA (o ácido nucleico de alguns vírus é RNA, o que exige uma etapa de transcrição reversa para síntese de cDNA, anterior à PCR propriamente) da amostra biológica, diluído em água livre de DNase e RNase ou em tampões de eluição de *kits* comerciais. O excesso de DNA pode inibir a reação de PCR, ao passo que a escassez pode dar origem a um resultado falso negativo ou ao insucesso da reação.

Etapas da PCR

A PCR é realizada no termociclador, equipamento que permite a replicação da região-alvo a ser estudada *in vitro*, mediante repetidos ciclos de temperaturas alternadas, de acordo com as seguintes etapas:

- Etapa de desnaturação: o termociclador eleva a temperatura da mistura a 94-96 °C, promovendo a separação da fita dupla de DNA em duas fitas simples, por meio da quebra das pontes de hidrogênio.

A abertura da fita dupla permite o acesso da polimerase e dos iniciadores à região-alvo. A temperatura de desnaturação (ou temperatura de *melting*) é aquela em que metade dos fragmentos de DNA está em dupla fita (pareado) e a outra metade em fita simples (desnaturado). A temperatura de *melting* (T_m) depende diretamente do tamanho do fragmento e da quantidade de guanina e citosina (G-C) do fragmento.

- Etapa de hibridização: A redução da temperatura para 55-70 °C possibilita a restauração de pontes de hidrogênio, permitindo que os iniciadores se hibridizem com a região-alvo do DNA por homologia durante o processo de renaturação. A temperatura de hibridização é aquela em que ocorre o pareamento entre os iniciadores e a fita de DNA molde. Essa temperatura é calculada de acordo com as propriedades do iniciador, tais como tamanho e composição das bases nitrogenadas. A estrincência da hibridização dos iniciadores determina a especificidade no produto de DNA a ser amplificado: temperaturas muito baixas resultam em menor estrincência (iniciador pode parear de forma inespecífica); temperaturas muito altas resultam em maior estrincência (iniciador pode não parear).
- Etapa de extensão: Com a hibridização do iniciador ao DNA-alvo, ocorre a formação de uma pequena dupla fita, que é reconhecida pela DNA polimerase. A enzima, então, acopla-se e adiciona as bases nitrogenadas complementares às da fita molde, a partir do último nucleotídeo do iniciador. Esse processo resulta na síntese de novas fitas de DNA complementares à original. A temperatura desta etapa varia de acordo com a enzima usada na reação (67 °C a 72 °C), e a duração depende do tamanho da região a ser amplificada e da capacidade de incorporação da enzima.

Um ciclo de PCR é composto das três etapas citadas anteriormente. O número de ciclos varia de acordo com a enzima utilizada e a quantidade de DNA molde presente na reação. Os múltiplos ciclos resultam no aumento exponencial da quantidade de DNA, ou seja, há relação entre amplificação (A), eficiência da reação (E) e o número de ciclos:

$$(C): A = (1+E)^C$$

Tipos de PCR

Os principais tipos de PCR são:

- *Nested* PCR: neste procedimento, dois conjuntos de iniciadores são utilizados em duas reações consecutivas. Na primeira PCR, um par de iniciadores é usado para gerar produtos de DNA contendo uma região-alvo. O produto da primeira PCR é, então, utilizado como molde para a segunda PCR, por meio de iniciadores internos, que hibridizam em uma região dentro do produto da primeira PCR. A reamplificação do produto de PCR aumenta a quantidade do material a ser trabalhado, melhorando a sensibilidade e a especificidade da reação.
- RT-PCR (PCR precedida de transcrição reversa): a PCR depende da presença de uma molécula de DNA. Portanto, no caso dos vírus compostos de RNA, uma etapa pré-PCR é necessária, com o uso da enzima transcriptase reversa. Essa enzima é responsável por gerar uma fita de DNA complementar (cDNA) à molécula de RNA, em uma etapa denominada transcrição reversa (RT, da sigla em inglês para *reverse transcription*). Na PCR, esse cDNA tem suas fitas de RNA degradadas, dando origem apenas a novas moléculas de DNA.
- PCR multiplex: a PCR multiplex permite que diferentes alvos sejam amplificados em uma mesma reação. Para que isso ocorra, diferentes pares de iniciadores são adicionados na mistura da reação, produzindo *amplicons* (produtos da reação) de tamanhos variados. Entretanto, essa reação precisa ser padronizada para evitar que os valores de sensibilidade e especificidade sejam menores do que aqueles observados na PCR.

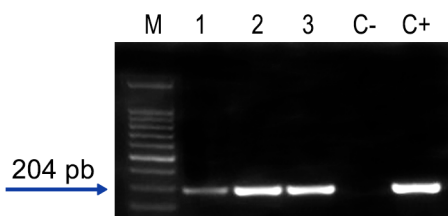
Eletroforese

Uma vez amplificado o ácido nucleico-alvo por PCR, a análise qualitativa ou quantitativa do material é comumente realizada por meio de eletroforese em gel. O produto da reação é, pois, aplicado em um gel de agarose, colocado em uma cuba e submetido à eletroforese. Nesse processo, os fragmentos de DNA previamente amplificados são separados de acordo

com seu tamanho e percebidos como bandas de comprimento equivalente ao ponto de aplicação da amostra. O tamanho da banda esperada equivale ao fragmento amplificado, delimitado pelos iniciadores. A eletroforese baseia-se em uma corrente de elétrons que migram de um polo negativo para um polo positivo. Como o DNA apresenta carga global negativa, deve ser aplicado próximo ao polo negativo da cuba para se deslocar em direção ao polo positivo. O intercalante de DNA tem carga positiva e migra para o polo negativo.

Com a migração do produto amplificado, ocorre a diferenciação dos tamanhos dos *amplicons*, de acordo com a posição das bandas formadas. Quanto menor o tamanho do fragmento, maior será a distância de migração no gel em relação ao ponto de aplicação. Do ponto de vista operacional, quanto menores os tamanhos esperados dos fragmentos, maior a concentração de agarose empregada na confecção do gel. Depois da eletroforese, o gel pode ser observado em um transiluminador, equipamento que emite radiação UV, excitando a fluorescência do intercalante de DNA (brometo de etídio, GelRed® etc.) contido no gel de agarose e permitindo que as bandas formadas sejam visualizadas. Um exemplo de eletroforese em gel de agarose para o diagnóstico em virologia pode ser visualizado a seguir (Figura 12).

Figura 12 – Exemplo de um gel de agarose após eletroforese, com a amplificação de um fragmento de 204 pares de bases (pb) nos poços 1, 2, 3 e no controle positivo da reação



M: Marcador de peso molecular (100 pb)
1 a 3: Amostras positivas para o parvovírus B19
C-: Amostra controle negativo
C+: Amostra controle positivo

ALVES, A. D. R. *Diagnóstico laboratorial da infecção pelo Parvovírus Humano B19 em pacientes com falência hepática aguda*, 2017. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

PCR em tempo real (qPCR)

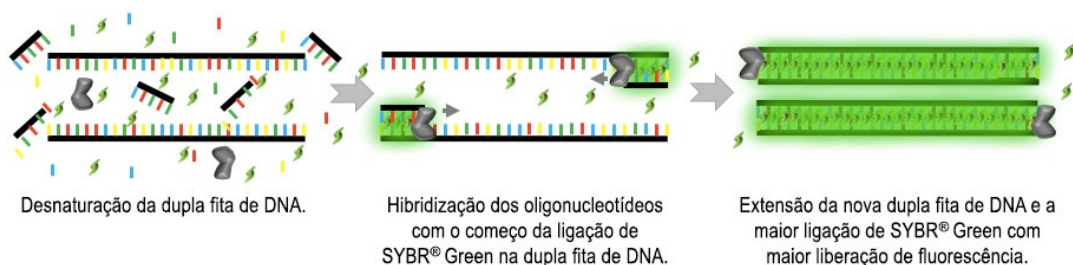
A qPCR permite que o produto amplificado seja detectado à medida que a reação acontece; por esse motivo, é chamada de PCR em tempo real. Os resultados da qPCR podem ser qualitativos (presença ou ausência de uma sequência) ou quantitativos (número de cópias de um fragmento de DNA). A técnica emprega um fluoróforo ou intercalante de DNA, como o sistema SYBR[®] Green, ou usa sondas de hidrólise de DNA marcadas com fluoróforos, como o sistema TaqMan[®]. Além desses compostos que emitem fluorescência, o termociclador da qPCR depende de um sistema de detecção de fluorescência e um *software* integrado ao computador, que permite a visualização simultânea do produto sendo amplificado.

SYBR[®] Green

O sistema SYBR[®] Green utiliza um fluoróforo intercalante que se liga covalentemente na fita dupla de DNA e, quando excitado pela luz, emite fluorescência verde. Sendo assim, quanto mais fitas duplas de DNA são geradas, mais moléculas ligam-se, aumentando o sinal de fluorescência, que pode ser detectada pelo sistema óptico do equipamento, acoplado ao computador. O aumento da intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto de PCR gerado. Para melhorar a especificidade da metodologia de SYBR[®] Green, é necessário adicionar uma etapa de curva de dissociação na qPCR, que permite discriminar moléculas-alvo por meio da T_m. Nessa etapa, a temperatura varia de 95 °C para 60 °C e, depois, novamente para 95 °C. A fluorescência produzida vai diminuindo, em razão da separação da dupla fita de DNA. Quando o equipamento detecta 50% da fluorescência original, a temperatura correspondente é determinada e a curva de dissociação montada.

As vantagens desse sistema são o baixo custo, as facilidades de uso – em relação aos demais sistemas de qPCR – e a alta sensibilidade. O esquema na Figura 13 demonstra o sistema de detecção por SYBR[®] Green.

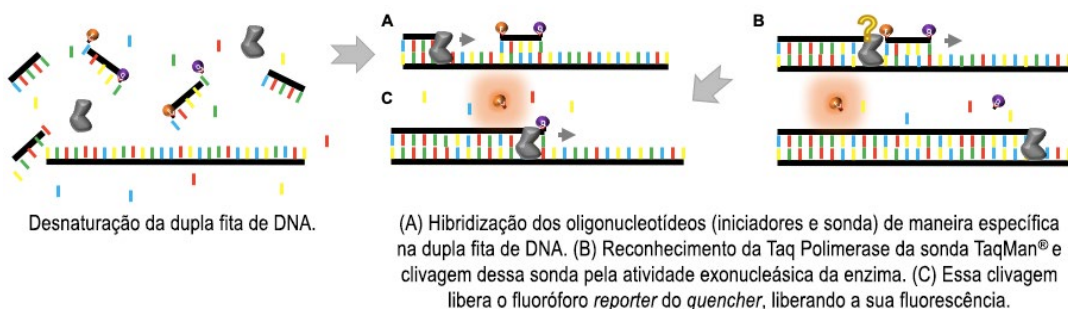
Figura 13 – Sistema de detecção pelo método SYBR® Green



TaqMan®

O Sistema TaqMan® utiliza uma enzima DNA polimerase com atividade de exonuclease e uma sonda. O uso da sonda aumenta a especificidade e acurácia dessa técnica em relação às demais desenvolvidas, pois como a sonda liga-se especificamente a uma sequência interna aos iniciadores da reação, não há sinais de luminescência durante a amplificação de produtos inespecíficos. Essa sonda TaqMan®, que se liga especificamente ao DNA molde, apresenta na extremidade 5' um fluoróforo *reporter* (molécula que emite a fluorescência) e, na extremidade 3', um *quencher* (molécula que captura a energia do fluoróforo *reporter*). Com a polimerização, a DNA polimerase encontra a sonda TaqMan® e, em razão de sua atividade exonucleásica, ocorre a clivagem dessa sonda, de modo a permitir que a molécula *reporter* se afaste do *quencher*; assim, a fluorescência é emitida. A emissão de fluorescência aumenta com a quantidade de produtos da reação e acaba sendo detectada pelo sistema óptico do equipamento. O esquema na Figura 14 ilustra o sistema de detecção por TaqMan®.

Figura 14 – Sistema de detecção pelo método TaqMan®

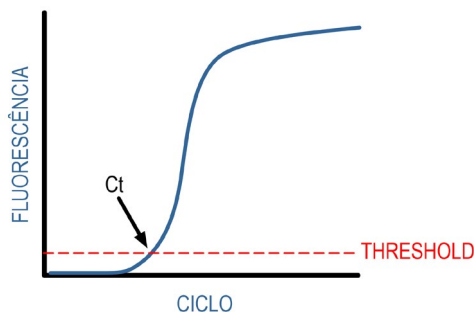


As etapas de amplificação do DNA na qPCR são semelhantes às da PCR convencional, acrescidas de uma etapa inicial de descontaminação, que depende da enzima Uracil N-glicosilase (UNG), ativada em 50 °C por dois minutos. Essa enzima diminui os ruídos de fluorescência, fazendo uma descontaminação prévia da placa; está presente em todas as misturas comercialmente disponíveis de qPCR.

Análise dos resultados da qPCR

Os resultados da qPCR são considerados para análise na fase exponencial, que fornece dados mais precisos para a quantificação. Nessa fase, dois valores são calculados: o *threshold* e o *cycle threshold* (Ct). A linha *threshold* (ou limiar) é o nível de detecção no qual a reação alcança uma intensidade fluorescente acima da base (*background* ou *baseline*). O valor Ct indica o número de ciclos necessários para que a fluorescência da amostra seja detectada acima da linha *threshold* e é calculado pelo número de ciclos em que a amplificação resulta em emissão de fluorescência suficiente para ser considerada um valor positivo. Comparando os valores de Ct de amostras de concentrações desconhecidas com uma série de padrões com concentrações de *amplicons* conhecidos, a quantidade de DNA em uma reação desconhecida pode ser determinada (Figura 15).

Figura 15 – Gráfico da curva de amplificação da qPCR



Tipos de quantificação

Existem dois métodos para determinar a quantidade de vírus (carga viral) através da qPCR:

- **Quantificação absoluta:** determina o número de cópias de vírus presentes em determinada amostra. Pode ser aplicada para a obtenção da carga viral nas amostras para vírus como hepatite B, hepatite C, HIV, entre outros. Para realizar a quantificação, deve-se construir uma curva-padrão de quantificação, com base em valores de carga viral já conhecidos. A curva-padrão pode ser obtida por diferentes métodos, tais como: painéis comerciais (DNA), clonagem de controles positivos em vetores de expressão e oligonucleotídeos sintéticos com o tamanho do produto de PCR. A curva-padrão de quantificação deve apresentar uma eficiência de 90% a 100%.
- **Quantificação relativa:** é utilizada quando não se faz necessário saber os valores absolutos de cópias virais em determinada amostra, mas sim o quanto esse valor aumentou (ou diminuiu) em relação à amostra de referência. Os resultados dessa quantificação são expressos em ordem de grandeza dos valores de Ct das amostras. Esse valor gera uma quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras, após ser corrigido e comparado pelo Ct dos genes normalizadores e das amostras-controles.

Outras metodologias de quantificação viral

Outras metodologias que permitem a quantificação viral:

- *High resolution melting (HRM):* surgiu em 2002, criada por meio de uma inovação tecnológica na metodologia de SYBR[®] Green da qPCR. Detecta T_m ainda mais específicas, uma vez que forma curvas de dissociação bem mais robustas, com base em um quantitativo maior de dados. Após a realização da qPCR, a placa utilizada é acoplada ao equipamento de HRM e permite a realização de aplicações como genotipagem, detecção de mutações e combinação de sequências.

O princípio do HRM é a T_m, definida pela temperatura específica em que ocorre o desnaturamento de 50% da fita dupla de DNA em fita simples. Essa temperatura é influenciada pelo tamanho do fragmento estudado (fragmentos maiores têm T_m maiores) e pela quantidade de pareamentos GC (guanina + citosina), pois esse pa-

reamento utiliza três ligações de hidrogênio, necessitando de mais energia (mais temperatura) para ser clivado.

A sua alta resolução deve-se à variação de temperaturas em 0,01 °C ocorrendo a cada milissegundo, gerando muitos dados para a construção da curva de dissociação. Essa variação em alta resolução permite detectar diferenças em bases únicas de cada sequência, sendo possível a genotipagem. Um componente fundamental para essa genotipagem são as amostras-padrão de cada genótipo procurado.

Após o preparo da placa de qPCR e a obtenção dos resultados de Ct, o operador transfere a placa para o equipamento de HRM, procedendo ao aumento da temperatura no equipamento. Esse aumento de temperatura faz com que a fita dupla de DNA seja clivada e, com isso, os intercalantes de DNA vão sendo liberados, diminuindo a fluorescência detectada. Quando a fluorescência está 50% menor que no início, significa que 50% do DNA foi desnaturado. É com base nessas informações que a curva de dissociação é montada.

- PCR digital: A técnica de PCR digital (dPCR), desenvolvida em 2006, permite a quantificação absoluta de amostras baseada na amplificação de uma única molécula molde de DNA. Em razão da alta sensibilidade da técnica e do particionamento da amostra, não há necessidade de preparo de curva-padrão (fundamental para a quantificação por qPCR). O uso dessa técnica depende do preparo da mistura contendo todos os reagentes necessários para a PCR, acrescida de uma sonda fluorescente.

No entanto, em lugar de aplicar essa mistura em uma placa, o operador deve colocar o tubo com a mistura em um equipamento carregador juntamente com o chip da dPCR. Esse equipamento faz o particionamento (ou emulsão) da mistura contendo a amostra em pequenas gotas. Cada gota contém todos os reagentes necessários para a PCR e uma única molécula de DNA. O particionamento seria o ponto crítico da dPCR. As gotas são carregadas uma em cada poço do chip e, no fim desse carregamento, cada minúsculo poço do chip contém uma molécula de DNA e todos os reagentes necessários para

sua amplificação. O chip é retirado do equipamento de carregamento e colocado em um termociclador convencional.

Após a termociclagem, os poços contêm uma quantidade conhecida de DNA, passível de ser detectada com base na intensidade de fluorescência. A leitura do chip de dPCR é realizada usando um *software*, que marca cada poço como positivo ou negativo. Ao fim da leitura, o equipamento gera a quantificação absoluta da amostra. As aplicações da dPCR são: detecção de vírus raros, quantificação realmente absoluta da carga viral e confecção precisa das curvas-padrão utilizadas na qPCR. Sequenciadores de nova geração utilizam a dPCR na quantificação de sua biblioteca e na validação dos dados gerados.

Sequenciamento do ácido nucleico viral

Outra técnica importante para os estudos de biologia molecular é o sequenciamento de DNA, que possibilita a determinação da ordem em que os nucleotídeos (adenina, guanina, citosina e timina) estão dispostos em uma molécula. Essa metodologia tornou-se indispensável para o conhecimento de sequências de DNA em diversos ramos da pesquisa em virologia, podendo ser aplicada para uso em diagnóstico, biotecnologia, genotipagem e caracterização molecular.

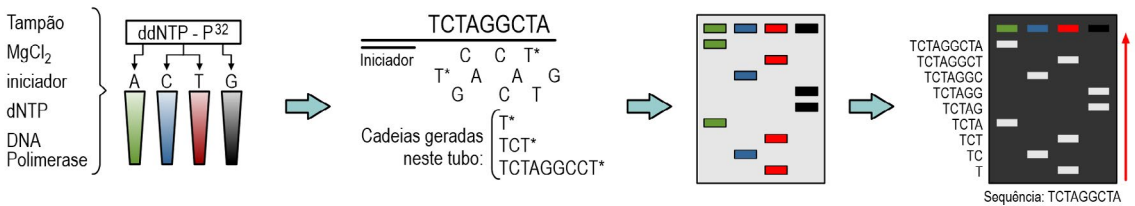
A primeira técnica de sequenciamento de nucleotídeos foi descrita em 1977 pelo pesquisador Frederick Sanger e colaboradores e denominada, por conseguinte, método de Sanger. Nesse método, utilizam-se moléculas conhecidas como terminadores de cadeia, como detalhado a seguir, para realizar o sequenciamento de nucleotídeos. Atualmente, variações dessa técnica são utilizadas e vêm sendo responsáveis pelos grandes avanços e descobertas sobre o genoma de diversos organismos, incluindo vírus, bactérias, protozoários, plantas, além do genoma humano.

A reação de sequenciamento baseia-se em uma PCR, com a inclusão de dideoxynucleotídeos (ddNTPs), nucleotídeos que impedem a incorporação do nucleotídeo seguinte, por isso a denominação “terminadores de cadeia”. Consistem em nucleotídeos modificados, que não contêm o radical

hidroxila (OH) no carbono 3' da pentose, impedindo, portanto, a formação da ligação fosfodiéster. Uma vez que esses ddNTPs são incorporados nas cadeias nascentes, essas cadeias são terminadas de forma prematura, gerando fragmentos de diversos tamanhos.

A primeira versão dessa técnica consistia na adição de cada um dos quatro ddNTPs em tubos separados, contendo todos os demais reagentes (Figura 16). Assim, em cada um dos quatro tubos eram gerados fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, indicando a posição que cada nucleotídeo ocupava naquela sequência de DNA. Devido à marcação radioativa dos iniciadores, a identificação da sequência nucleotídica era realizada depois da separação dos fragmentos gerados em eletroforese em gel de acrilamida, posterior revelação por autorradiografia e leitura manual – do menor fragmento em direção ao maior –, para a aferição da ordem nucleotídica.

Figura 16 – Método de Sanger de sequenciamento de nucleotídeos



A utilização de marcadores fluorescentes nos ddNTPs permitiu o desenvolvimento de sequenciadores automatizados. O sequenciamento automatizado utiliza o mesmo princípio do método de Sanger. Contudo, a utilização de ddNTPs marcados com diferentes fluoróforos e o uso de eletroforese capilar permitiram um grande avanço, tanto em qualidade quanto em quantidade das sequências geradas. Atualmente, a leitura das sequências está diretamente associada a um programa de computador (Figuras 17 e 18), apresentando inúmeras vantagens em relação ao método antigo (que, além de manual, era extremamente laborioso, demorado, e utilizava elementos radioativos). Nessa nova técnica, a reação passou a ser realizada em um único tubo, já que os nucleotídeos são marcados com quatro fluoróforos distintos, e a confecção de grandes géis de acrilamida também foi abolida.

Figura 17 – Método automatizado de sequenciamento de nucleotídeos

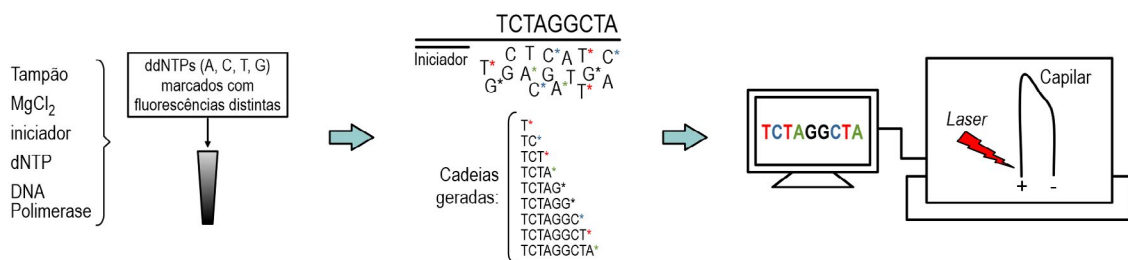
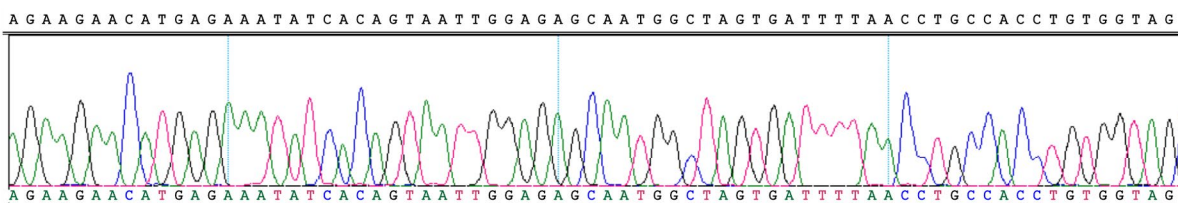


Figura 18 – Exemplo de eletroferograma obtido por meio de sequenciamento



ALVES, A. D. R. *Diagnóstico laboratorial da infecção pelo Parvovírus Humano B19 em pacientes com falência hepática aguda*, 2017. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

PCR versus sequenciamento

Apesar das similaridades entre os processos, o método conhecido como amplificação prévia ao sequenciamento é diferente do método classicamente utilizado na PCR. A PCR produz milhões de cópias de uma região do DNA com base em cópias do DNA molde. Cada cópia produzida durante a PCR, em cada ciclagem, torna-se um novo molde para o próximo ciclo. Além disso, na reação de PCR utilizam-se iniciadores dos dois lados da fita de DNA (senso e antissenso). Assim, em uma única ciclagem da PCR, uma cópia da fita molde original produz duas cópias e essas duas cópias, no ciclo seguinte, geram mais quatro cópias, e assim por diante. Esse método de amplificação é chamado de amplificação exponencial.

No método de amplificação prévia ao sequenciamento, usa-se um iniciador em vez de dois, e o processo de amplificação copia apenas uma das fitas do DNA. Essa cópia segue a mesma direção do iniciador e não

pode ser usada como molde para os ciclos posteriores. Portanto, todas as amplificações são realizadas diretamente com base nas fitas molde originais. Com isso, é necessário dispor de mais quantidade de DNA molde para gerar um sinal fluorescente suficiente para leitura nos sequenciadores automáticos. Sendo assim, o sequenciamento é classificado como um método de amplificação linear.

Sequenciamento de alto desempenho

O método de Sanger abriu portas para o desenvolvimento de novas metodologias, no intuito de que o sequenciamento de DNA se tornasse cada vez mais eficaz e aplicável. O sequenciamento de alto desempenho, ou de nova geração (NGS, sigla do inglês para *next generation sequencing*), é uma inovação tecnológica do sequenciamento de Sanger, que aumenta o rendimento da reação ao reduzir o custo por base sequenciada. Em apenas uma reação, tais sequenciadores são capazes de ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo, gerando uma quantidade enorme de dados com base em uma pequena quantidade de material biológico (*high throughput*), ao passo que um sequenciador de Sanger processa, no máximo, 96 fragmentos por vez. Existem diversas metodologias NGS disponíveis no mercado com grandes diferenças entre si, porém todos os sequenciadores de nova geração baseiam-se no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA. As metodologias NGS são aplicadas na identificação de novos vírus e em estudos de evolução viral, entre outros.

O conceito em todas as metodologias NGS é comum: as bases de um fragmento de DNA são sequenciadas por meio de sinais emitidos à medida que cada fragmento é ressintetizado na fita de DNA molde. As metodologias NGS estendem esse processo a milhões de reações que ocorrem de forma paralela, permitindo a produção de centenas de gigabases (Gb) de dados em uma única reação. Entretanto, o custo por reação é ainda bastante elevado, em razão do uso de reagentes como bases marcadas e complexos enzimáticos imobilizados.

No Quadro 1 comparam-se alguns aspectos entre as principais metodologias NGS existentes no mercado atualmente. A decisão sobre qual

metodologia utilizar depende dos recursos disponíveis, da infraestrutura do laboratório, da experiência dos operadores e do tipo de aplicação que está sendo considerada.

Quadro 1 – Visão geral das metodologias de sequenciamento de nova geração (NGS)

Metodologia	Tecnologia de sequenciamento	Ano	Reação	Vantagem	Desvantagem
Ion Torrent	Semicondutores	2007	A reação de polimerização gera um próton (H ⁺) que altera o pH do meio, sendo detectada por um transistor e convertida em um sinal elétrico.	<ul style="list-style-type: none"> • Custo do equipamento • Rapidez da corrida • Diferentes chips e instrumentos 	<ul style="list-style-type: none"> • Altas taxas de erro em regiões homopoliméricas
Illumina	Síntese	2009	A biblioteca de fragmentos ligada a adaptadores específicos é submetida à amplificação em ponte, usando oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. Os quatro nucleotídeos são adicionados para serem incorporados aos fragmentos, pois cada um carrega marcadores fluorescentes específicos. Um algoritmo monta a sequência final de cada fragmento, gerando valores de qualidade e removendo sequências ruins.	<ul style="list-style-type: none"> • Maior número de leituras por corrida e menor custo por base • Ampla gama de plataformas 	<ul style="list-style-type: none"> • Erros de substituição • Custo do equipamento
SOLiD	Ligação	2006	Catalisado por um DNA ligase, os fragmentos são sequenciados pela ligação de sondas marcadas com fluoróforos. A fita é desnaturada e ocorre uma nova reação, repetida cinco vezes, o que permite sobrepor os resultados para decodificar toda a sequência do fragmento, reduzindo a chance de erros de sequenciamento.	<ul style="list-style-type: none"> • Alta acurácia (~99,99%), pois cada base é sequenciada diversas vezes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Deixa de detectar variantes ou detecta falsas variantes. • Realiza Leituras muito curtas (~75 pb). • Efetua corridas demoradas (podendo levar dias para serem completadas).

Quadro 1 – Visão geral das metodologias de sequenciamento de nova geração (NGS) (cont.)

Metodologia	Tecnologia de sequenciamento	Ano	Reação	Vantagem	Desvantagem
PacBio	Molécula única em tempo real	2011	Sequenciamento pela tecnologia de síntese. As amostras ficam em micropoços translúcidos, onde é observado cada nucleotídeo sendo incorporado à fita de DNA crescente. O sinal produzido pode ser lido com o mínimo de interferência dos fluorocromos em solução, resultando no sequenciamento do DNA em tempo real.	<ul style="list-style-type: none"> • Fragmentos longos com uma média de ~20000 pb • Alta acurácia (~99,99%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Processividade limitada • Custo do equipamento • Necessidade de espaço para instalação do equipamento
MinION	Molécula única em tempo real por nanoporo	2014	Quando o DNA passa pelo nanoporo, ocorre uma mudança no padrão ou magnitude da corrente elétrica que é observada e caracterizada, pois cada nucleotídeo tem uma alteração diferente ao passar pelo nanoporo. Os dados são processados, gerando a sequência do DNA.	<ul style="list-style-type: none"> • Menor plataforma disponível até o momento • Útil para pesquisa em campo (rápida resposta clínica) • Poucas restrições quanto ao tamanho dos fragmentos • Custo do equipamento 	<ul style="list-style-type: none"> • Altas taxas de erro (~30%) • Dificuldades na identificação de longos homopolímeros

Em virtude da alta sensibilidade e especificidade dos testes moleculares, além da rápida obtenção de resultados em comparação com as metodologias tradicionais, a PCR – e suas variações – vem sendo utilizada com frequência para o diagnóstico de diversas doenças, pois permite a detecção de infecções recentes. As metodologias sorológicas, tais como Elisa, que se baseiam na detecção de anticorpos gerados contra determinado antígeno, tornam-se ineficazes por ocasião do período de janela imunológica (tempo decorrido entre a infecção e o aparecimento ou a detecção de anticorpos específicos contra a infecção). Contudo, são muito úteis para vigilância epidemiológica, verificação da resposta vacinal e/ou infecções presentes ou passadas.

Logo, a decisão de qual tipo de teste deve ser realizado para o diagnóstico da infecção viral depende de inúmeros fatores, como agente viral, sintomas e período de infecção, objetivo e perguntas da pesquisa, tipo de diagnóstico, além dos recursos disponíveis e da infraestrutura do laboratório.

Bibliografia Consultada/Sugerida

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H. & POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders, 2015.

ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALVES, E. A. & GUIMARÃES, A. C. R. Manutenção de linhagens de células animais. Manual da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

AMBARDAR, S. *et al.* High Throughput Sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, 56(4): 394-404, 2016.

ANDERSON, L. J. *et al.* Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(4): 522-526, 1986.

BLUTH, M. J. & BLUTH, M. H. Molecular pathology techniques: advances in 2018. *Clinics in Laboratory Medicine*, 32(2): 215-236, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Calendário de vacinação 2020. Disponível em: <www.saude.gov.br/saude-de-a-z/vacinacao/calendario-vacinacao>. Acesso em: 24 mar. 2023.

BUSCH, M. P. *et al.* Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion*, 35(2): 91-97, 1995.

CRADOCK-WATSON, J. E. & RIDEHALGH, M. K. S. Specific immunoglobulin responses after varicella and herpes zoster. *Journal of Hygiene*, 82: 319-336, 1979.

DENIS, F. *et al.* Comparison of 10 enzyme immunoassays for detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(5): 1.000-1.004, 1988.

- FULTON, R. E. & MIDDLETON, P. J. Immunofluorescence in diagnosis of measles infections in children. *The Journal of Pediatrics*, 86(1): 17-22, 1975.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D. & MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6): 333-351, 2016.
- GOOTENBERG, J. *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6.336): 438-442, 2017.
- HAHN, A. *et al.* On detection thresholds – a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Tropica*, 205:105377, 2020.
- KIRCHER, M. & KELSO, J. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. *Bioessays*, 32(6): 524-536, 2010.
- KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2013.
- LENNETTE, E. H. & SMITH, T. F. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1999.
- LU, H.; GIORDANO, F. & NING Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 14(5): 265-279, 2016.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. J. Advances in immunology: innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343: 338-344, 2000.
- MOROZOVA, O.; HIRST, M. & MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual Review Genomics and Human Genetics*, 10: 135-151, 2009.
- MURPHY, K. & WEAVER, C. *Imunobiologia de Janeway*. 9. ed. Garland Science, 2017.
- PERES, C. M. & CURI, R. *Como Cultivar Células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- QUAN, P. L.; SAUZADE, M. & BROUZES, E. dPCR: a technology review. *Sensors*, 18(4): 1.271, 2018.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5.463-5.467, 1977.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V. & WIGG, M. D. *Virologia Humana*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SCHRODER, K. & TSCHOPP, J. The Inflammasomes. *Cell*, 140(6): 821-832, 2010.

TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6): 805-820, 2010.

VAN DIJK, E. L. *et al.* Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genetics*, 30(9): 418-426, 2014.