

Métodos Diagnósticos en Virología

1. Métodos Directos
2. Métodos Indirectos (Aislamiento viral)
3. Serología

Métodos Directos

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Detección de Antígeno | immunofluorescencia, ELISA etc. |
| 2. Microscopía electrónica | morfología de las partículas
microscopía immunoelectrónica |
| 3. Microscopía de luz | histología
cuerpos de inclusión |
| 4. Detección de Genoma | hibridización con sondas específicas
polymerase chain reaction (PCR) |

Métodos Indirectos

1. Cultivo Celular

efecto citopático (CPE)

hemabsorción

immunofluorescencia

2. Huevos

pústulas en membrana corioalantoidea

hemaglutinación

cuerpos de inclusión

3. Animales

enfermedad, muerte

Serología

Detección de títulos en aumento entre suero de período agudo y convalesciente

Detección de IgM en la infección primaria.

Classical Techniques

1. Complement fixation tests (CFT)
2. Haemagglutination inhibition tests
3. Immunofluorescence techniques (IF)
4. Neutralization tests
5. Counter-immunoelectrophoresis

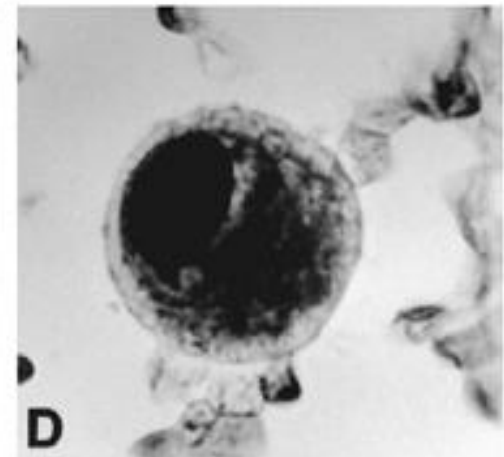
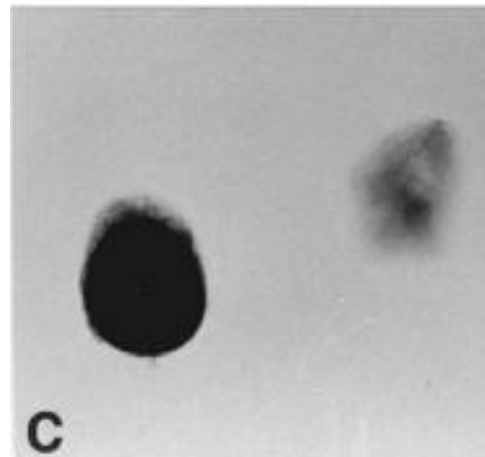
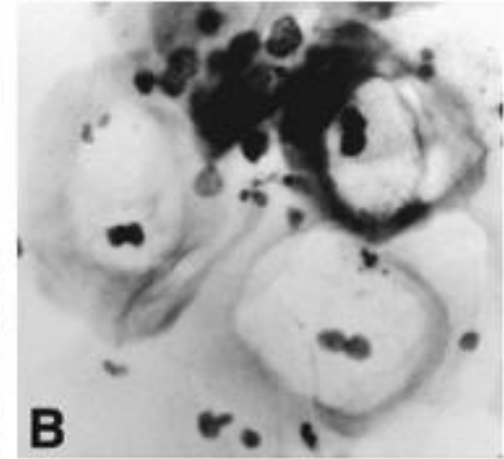
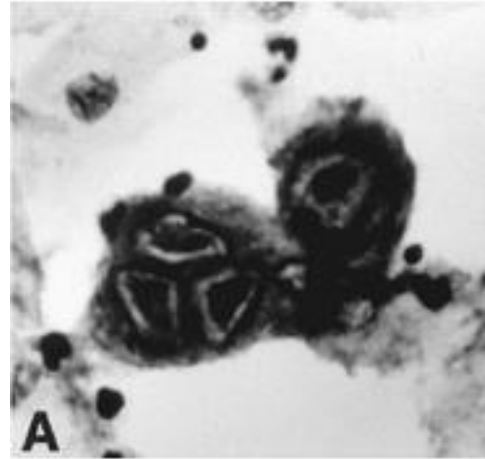
Newer Techniques

1. Radioimmunoassay (RIA)
 2. Enzyme linked immunosorbent assay (EIA)
 3. Particle agglutination
 4. Western Blot (WB)
 5. RIBA, Line immunoassay
-

Métodos Directos

Hallazgos citológicos sugestivos de infección viral

- A. Extensión de Tzanck: detección rápida de HSV o VZV en lesiones de piel (Wright, Giemsa u otras tinciones).
- B. Papanicolaou: HPV (koilocytosis).
- C. Células epiteliales urinarias: núcleo agrandado con cromatina borrosa y pequeña inclusión vidriosa indicativa de infección por poliomavirus.
- D. Lavaje broncoalveolar: gran inclusión nuclear con espacio perinuclear claro (ojo de lechuza) indicativo de infección por citomegalovirus.



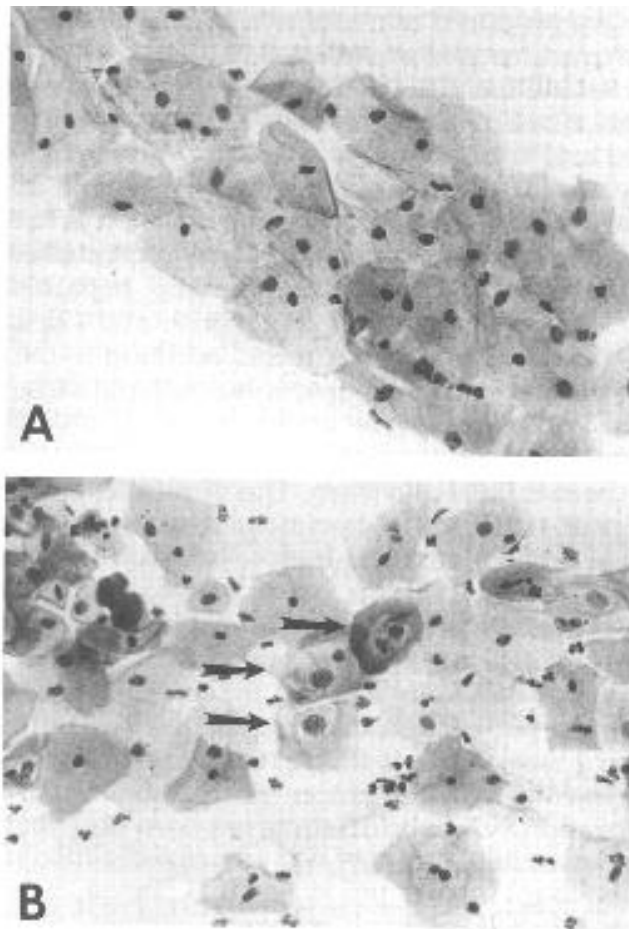


Figure 21-4

Papanicolaou stain. (A) Normal exfoliated cervical squamous epithelial cells. The nucleus is small and compact, and the cytoplasm is abundant in these mature, keratinized epithelial cells. (B) Koilocytic atypia. The nuclei in some of these superficial cells are enlarged with coarse, clumped chromatin, and there is a pallor or clearing in the cytoplasm (arrow) ($\times 250$).

Métodos Directos

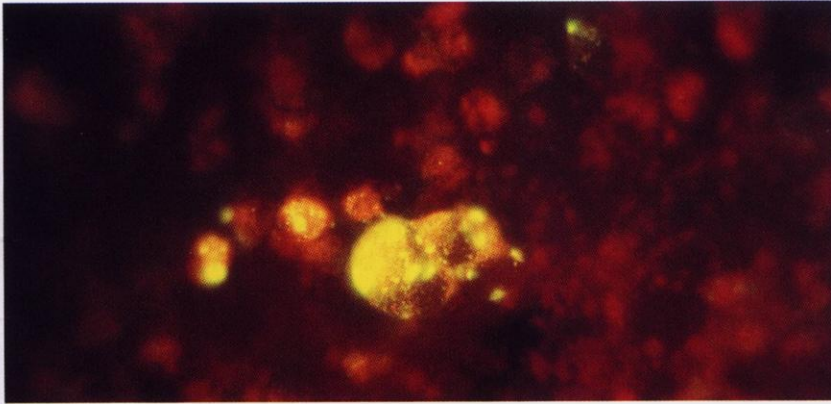
Detección de antígenos virales

Viral antigen detection: specimens used and viruses detected

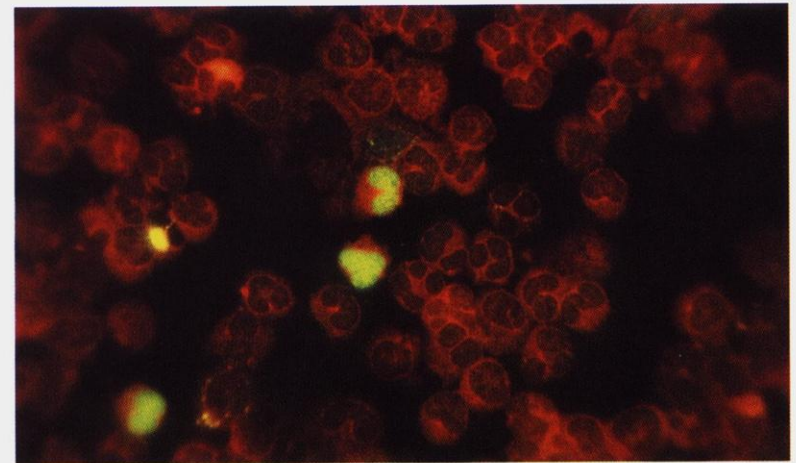
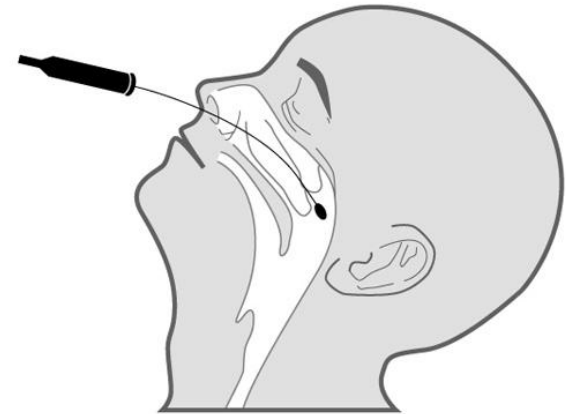
Specimen	Viruses Detected
Respiratory (nasopharyngeal swab or aspirate, nasopharyngeal wash, tracheal aspirate, bronchoalveolar lavage)	Respiratory syncytial Influenza A,B Parainfluenza 1-3 Adenovirus Measles
Skin or mucous membrane scraping	Herpes simplex Varicella zoster
Conjunctival or corneal scraping	Herpes simplex Adenovirus
Stool	Rotavirus
Blood	Adenovirus (enteric serotypes) Cytomegalovirus (pp65) Hepatitis B (surface antigen) Human immunodeficiency (p24)

Métodos Directos

Inmunofluorescencia con Acs Mo sobre material clínico



Human naso-pharyngeal secretion: immunofluorescence for Respiratory syncytial virus (RSV) using NCL-RSV3-FITC. Note intense staining of RSV infected respiratory epithelial cells. Acetone-fixed clinical material.



Antigenaemia positive peripheral polymorphonuclear leukocytes: immunofluorescence for Cytomegalovirus pp65 antigen using NCL-CMVpp65. Note characteristic nuclear staining. Formalin/sucrose-fixed cytopsin preparation.

Immunofluorescence

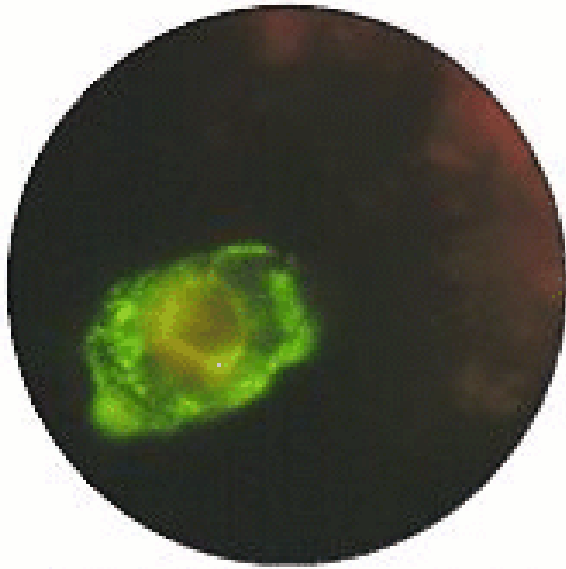
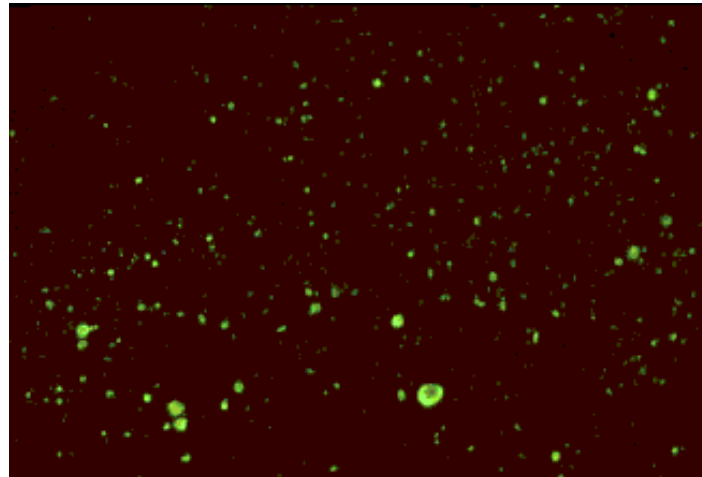


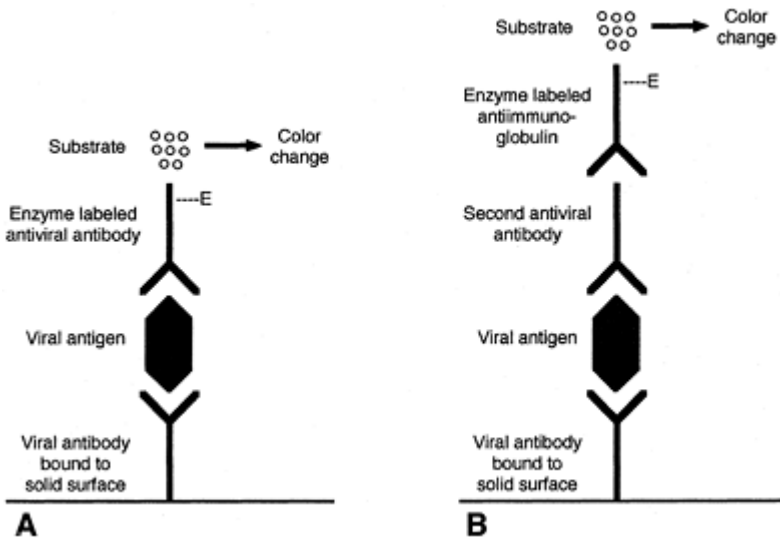
Fig. 3. HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

(Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)



Positive immunofluorescence test for rabies virus antigen. (Source: CDC)

Métodos Directos Inmunoensayos



Enzimoinmunoensayos,

inmunoensayos de membrana

Microscopía Electrónica

10^6 virus particles per ml required for visualization, \times 50,000 - 60,000 magnification normally used. Viruses may be detected in the following specimens.

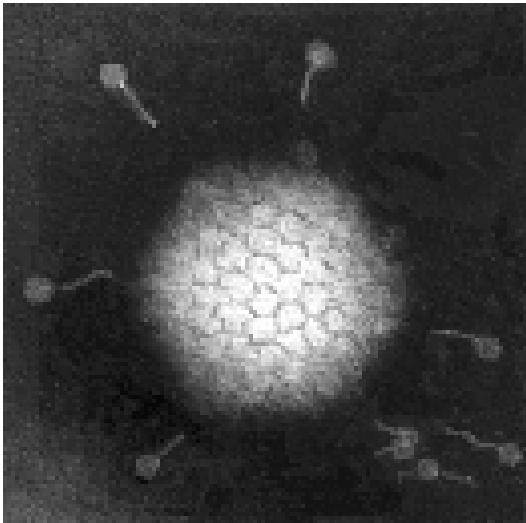
Faeces	Rotavirus, Adenovirus, Norwalk like viruses, Astrovirus, Calicivirus
Vesicle Fluid	HSV, VZV
Skin scrapings	papillomavirus, molluscum contagiosum

The sensitivity and specificity of EM may be enhanced by **immune electron microscopy**. There are two variants:

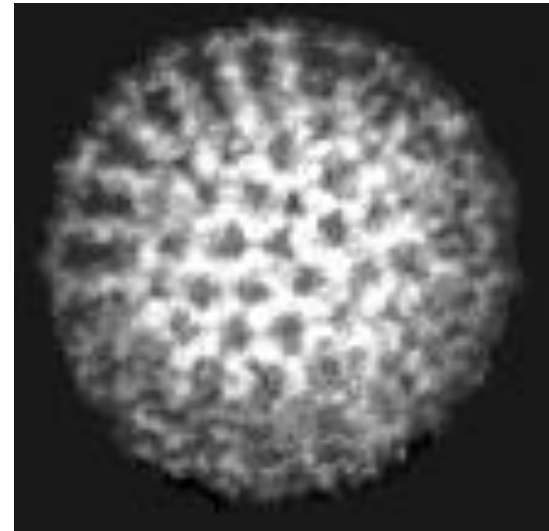
Classical Immune electron microscopy (IEM) - the sample is treated with specific anti-sera before being put up for EM. Viral particles present will be agglutinated and thus congregate together by the antibody.

Solid phase immune electron microscopy (SPIEM) - the grid is coated with specific anti-sera. Virus particles present in the sample will be absorbed onto the grid by the antibody.

Microscopía Electrónica



Adenovirus



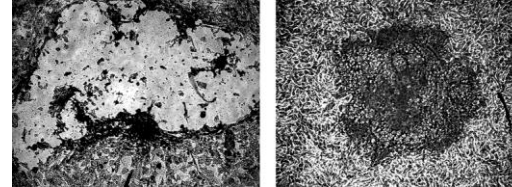
Rotavirus

(courtesy of Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)

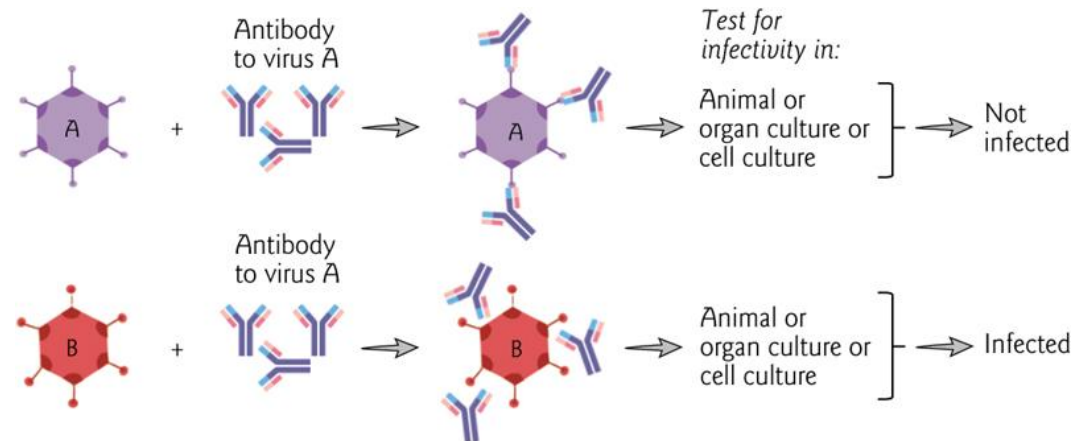
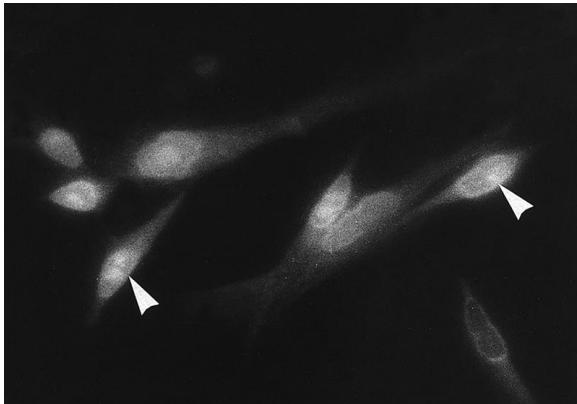
Cultivo Viral

Crecimiento puede producir:

1. Efecto citopático (CPE) – redondeamiento, sincitios
2. Hemadsorción



Confirmación por neutralización, inhibición de la hemadsorción, inmunofluorescencia.



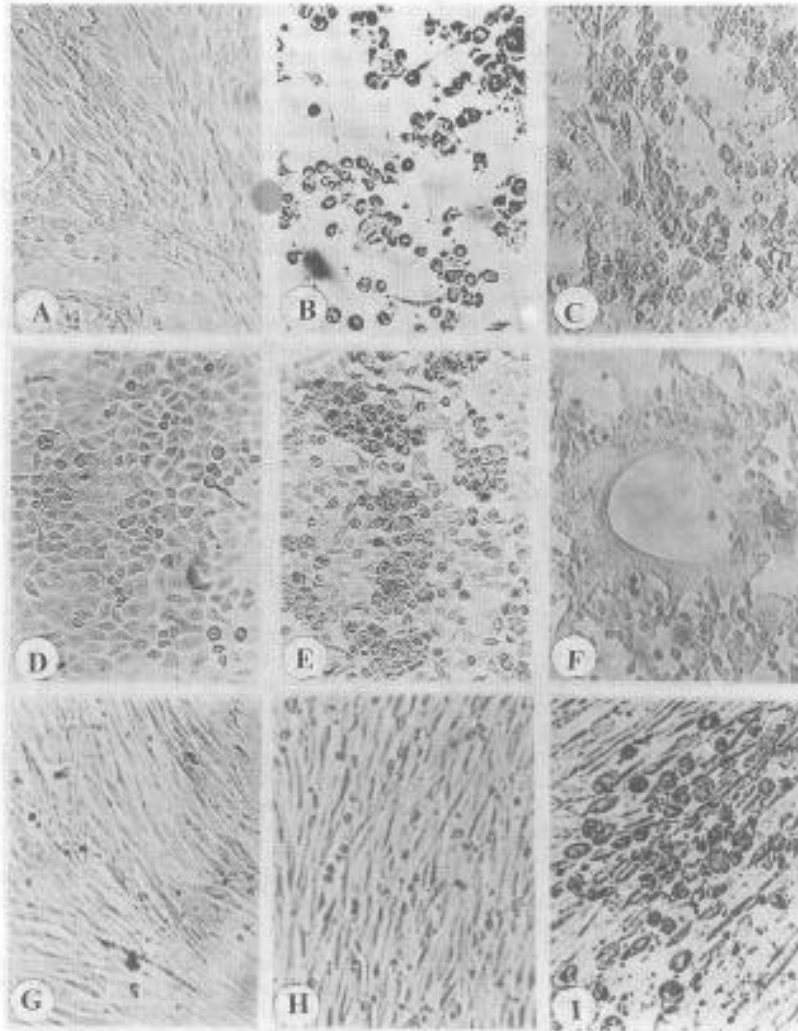
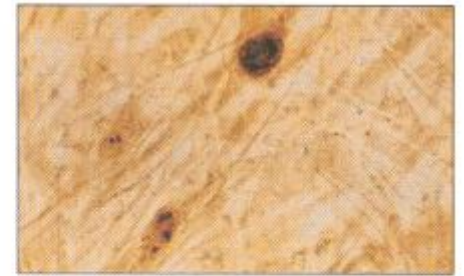


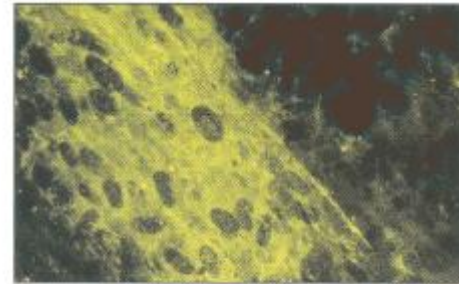
FIGURE 2 Examples of characteristic CPEs of different viruses. (A) Uninfected RbMK cells; (B) poliovirus CPE in RbMK cells; (C) influenza B virus CPE in RbMK cells; (D) uninfected HEp-2 cells; (E) adenovirus CPE in HEp-2 cells; (F) RSV CPE in HEp-2 cells; (G) uninfected HDFs; (H) rhinovirus CPE in HDFs; and (I) CMV CPE in HDFs.



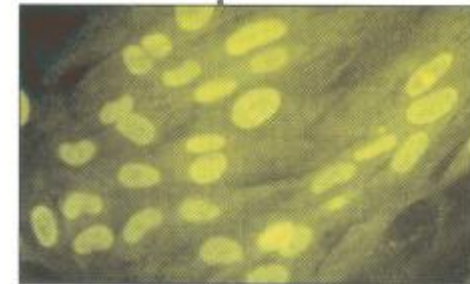
HHV-6 A (TAN) variant immunoperoxidase detection on infected human fibroblast cell culture. Detection with monoclonal antibody 8C8 4/40. Courtesy of Pr H. Agut and C. Robert, Virology laboratory, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France.



HHV-6 A (TAN) variant immunoperoxidase detection on infected human fibroblast cell culture. Detection with monoclonal antibody 7C7 45/15. Courtesy of Pr H. Agut and C. Robert, Virology laboratory, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France.



Vaccinia zoster virus immunofluorescence detection on infected cells, using monoclonal antibody clone T1U1. Courtesy of Dr M. Harzic, Versailles hospital, France.

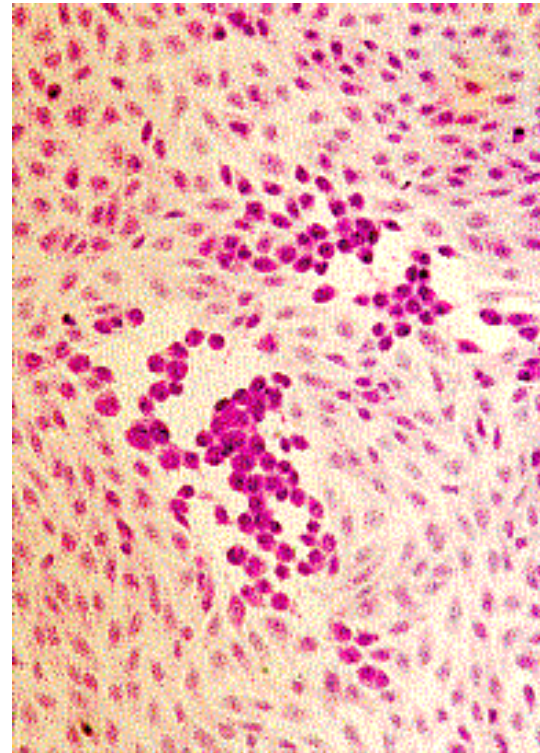


HCMV Immediate Early 48 hours immunofluorescence detection on MRC 5 cell culture using monoclonal antibody clone E13. Courtesy of Pr F. Peroc, Virology laboratory, Saint Louis hospital, Paris, France.

CPE(1)

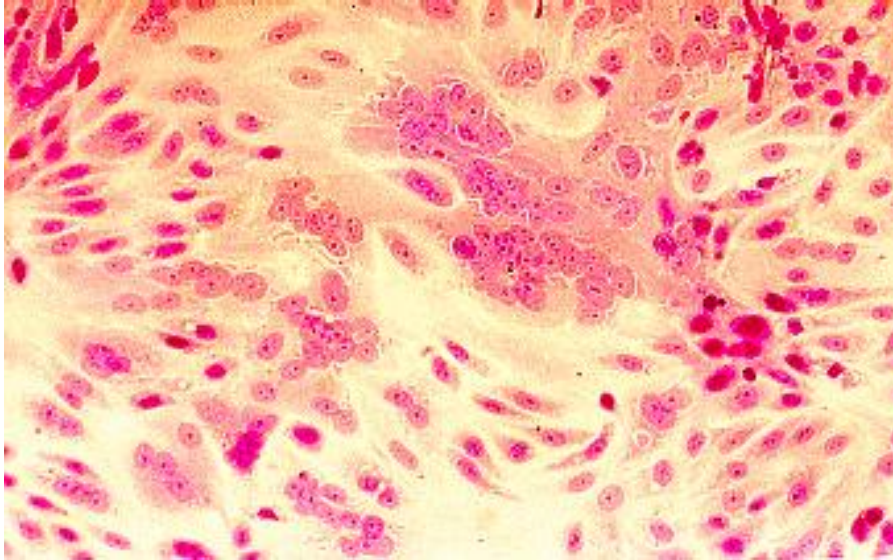


Fig. 1. Cytopathic effects of enterovirus 71 in rhesus monkey kidney cells



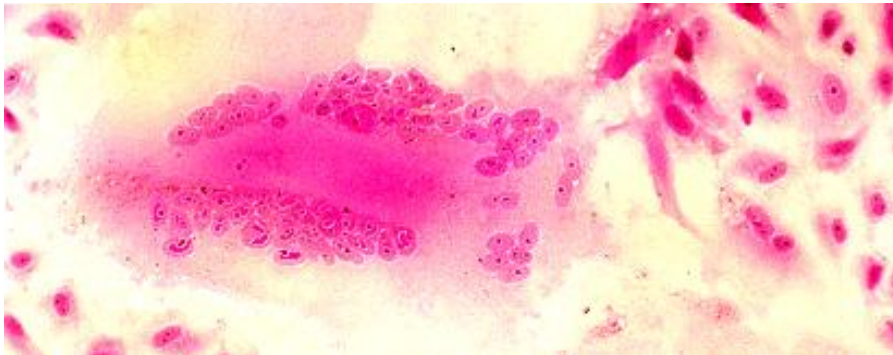
Cytopathic effect of enterovirus 71 and HSV in cell culture: note the ballooning of cells.
(Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital, Linda Stannard, University of Cape Town)

CPE (2)

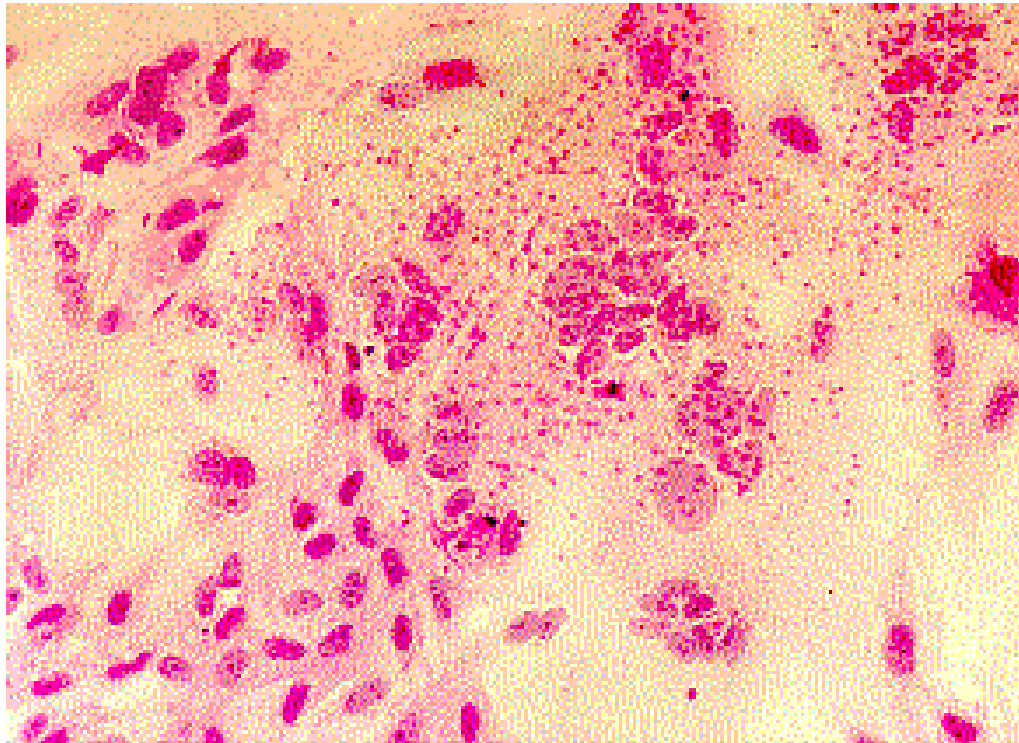


Syncytium formation in cell culture caused by RSV (top), and measles virus (bottom).

(courtesy of Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)



Haemadsorption



Syncytial formation caused by mumps virus and haemadsorption of erythrocytes onto the surface of the cell sheet.

(courtesy of Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)

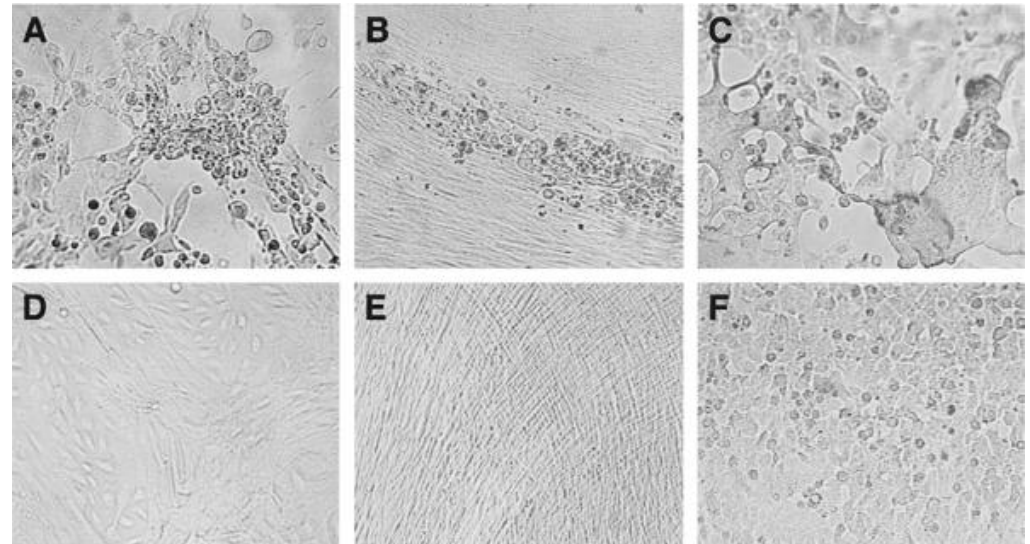
Virus aislados por cultivo

Viruses readily isolated by cell culture

Herpes Simplex
Cytomegalovirus
Adenoviruses
Polioviruses
Coxsackie B viruses
Echoviruses
Influenza
Parainfluenza
Mumps
Respiratory Syncytial Virus

Less frequently isolated viruses

Varicella-Zoster
Measles
Rubella
Rhinoviruses
Coxsackie A viruses



Virus Isolation

Cell Cultures are most widely used for virus isolation, there are 3 types of cell cultures:

1. Primary cells - Monkey Kidney
2. Semi-continuous cells - Human embryonic kidney and skin fibroblasts
3. Continuous cells - HeLa, Vero, Hep2, LLC-MK2, MDCK

Primary cell culture are widely acknowledged as the best cell culture systems available since they support the widest range of viruses. However, they are very expensive and it is often difficult to obtain a reliable supply. Continuous cells are the most easy to handle but the range of viruses supported is often limited.

Problemas con el cultivo

- Largo tiempo requerido (hasta 4 semanas).
- Frecuentemente hay pobre sensibilidad (dependiendo de la calidad del espécimen).
- Susceptible de contaminación bacteriana.
- Susceptible a toxicidad del espécimen.
- Muchos virus no crecen en cultivo. Ej Hepatitis B, virus de diarreas, parvovirus, papillomavirus.

Técnicas de cultivo rápido

Shell vial

Resultado disponible en cuanto se expresan los antígenos. Detectados por Ac Mo. Ej.: CMV DEAFF (Detection of Early Antigen Fluorescent Foci).

La monocapa se crece sobre cubres.

Inoculación, centrifugación a baja velocidad 1 h.

Incubación 2-4 días.

Fijado y tinción del cubre por inmunofluorescencia.

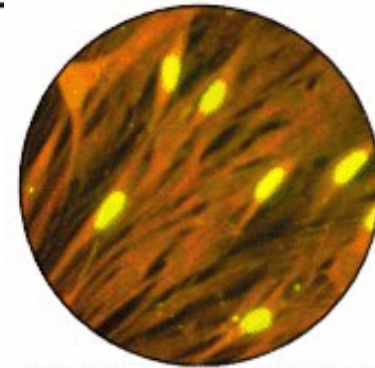
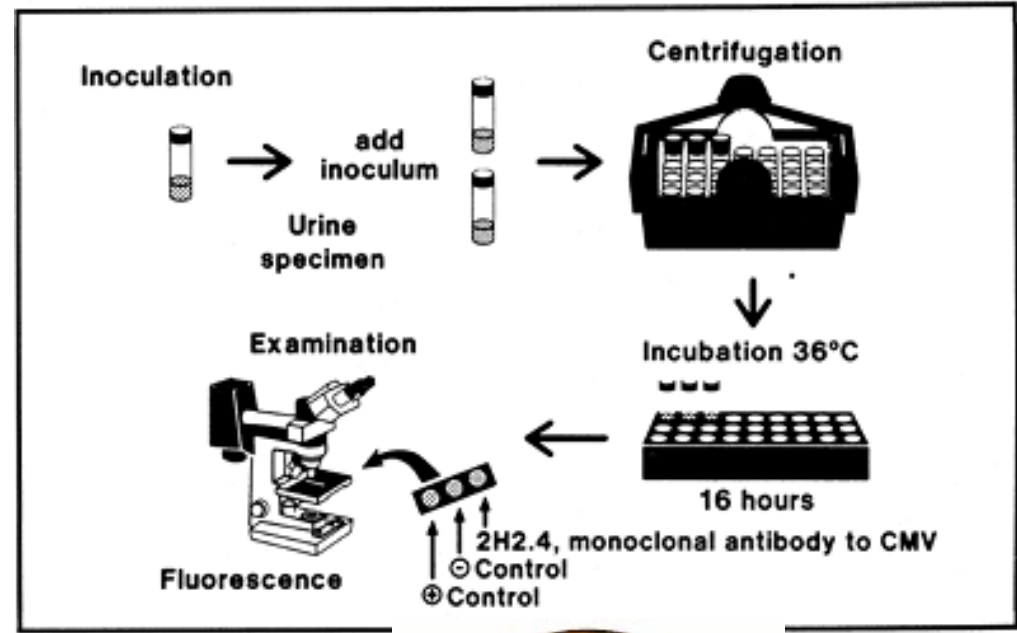
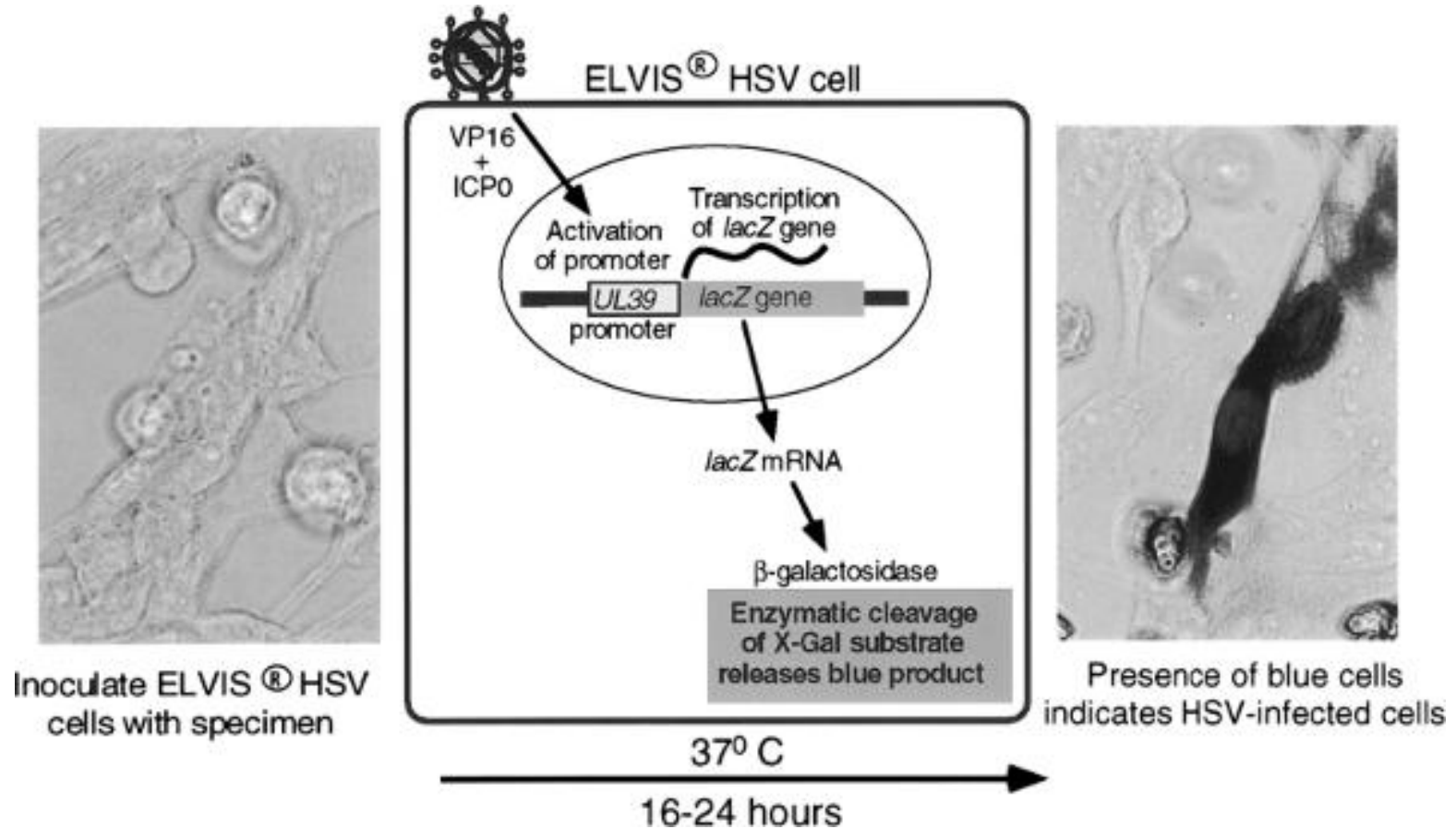


Fig. 2. CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

Técnicas de Cultivo Rápido

Células ELVIS



(Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)

Serología

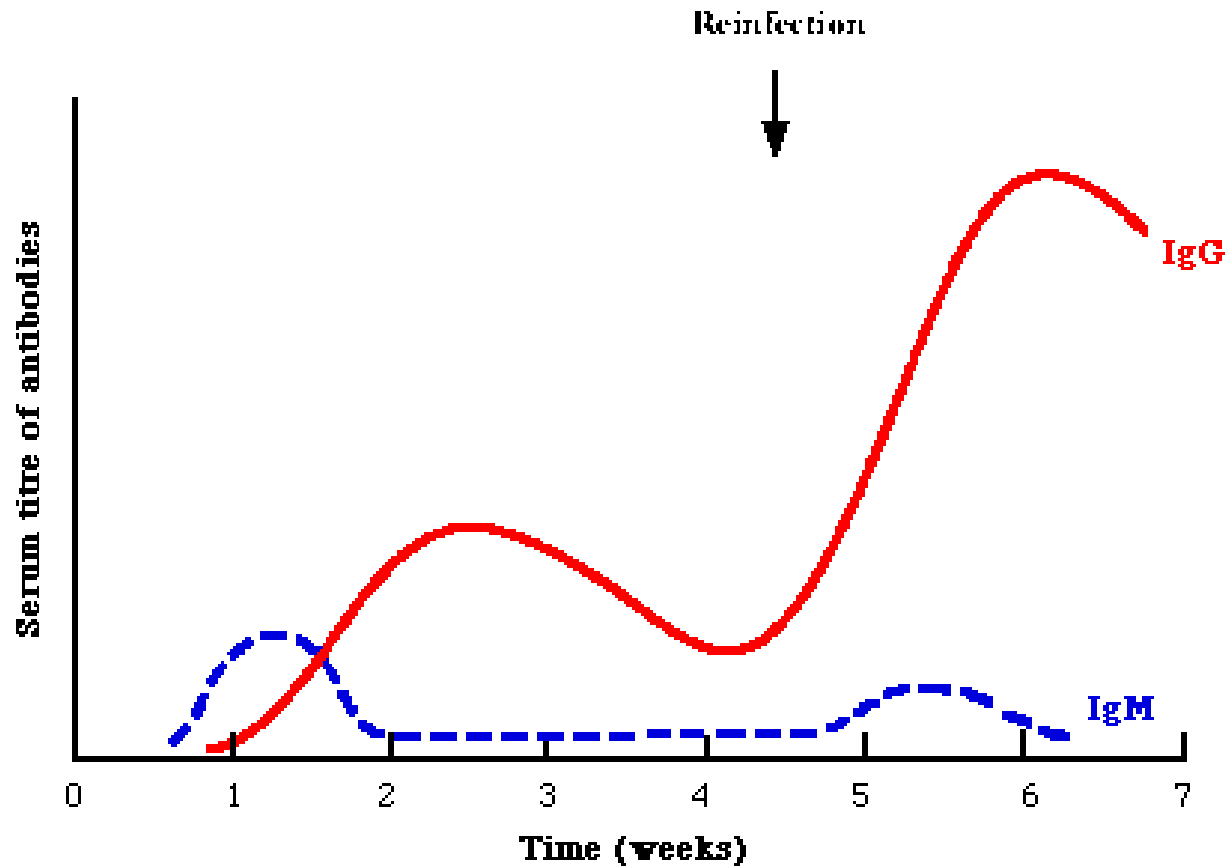
Criterio para el diagnóstico de infección primaria

- Cuadruplicación de título de IgG (agudo-convalescente)
- Presencia de IgM
- Seroconversion
- IgG o Acs en alto título (no confiable)

Reinfección

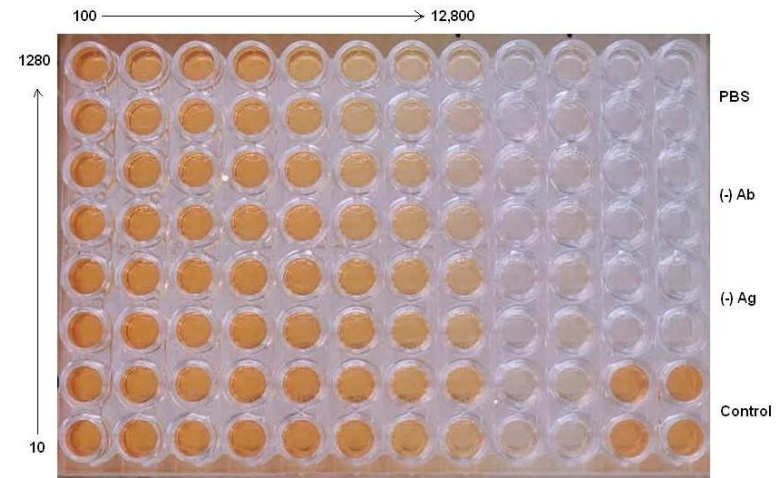
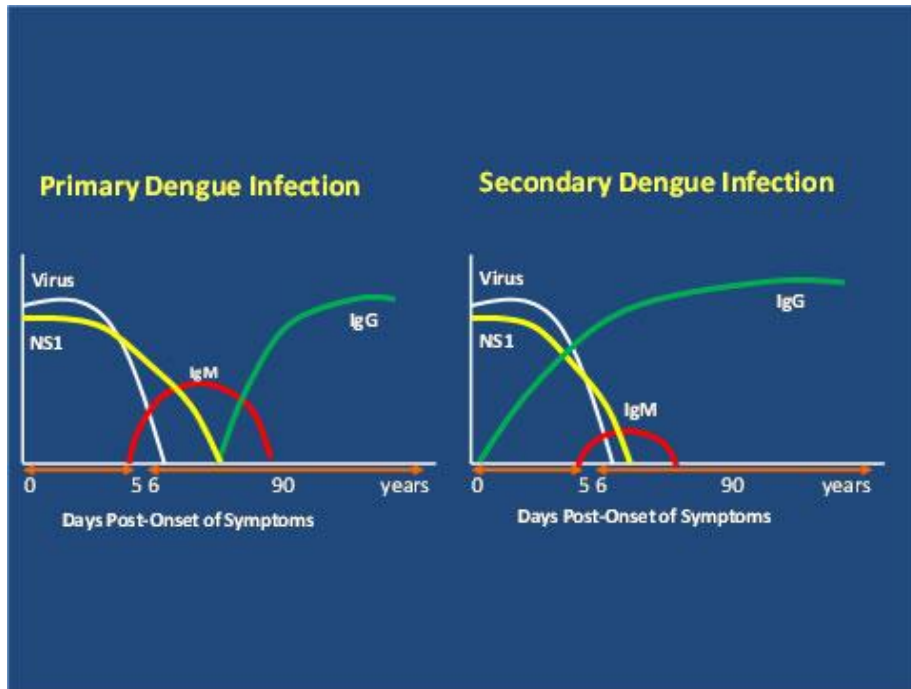
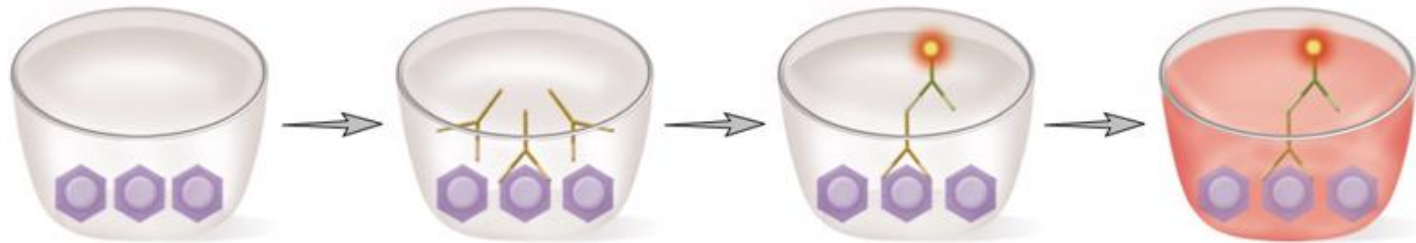
- Incremento de IgG (agudo-convalescente)
- Ausencia o ligero incremento de IgM

Perfil serológico típico. Infección aguda



Serología

EIA



Inf. Aguda: IgM o IgG
Cuadruplicación de títulos
e/sueros agudo y convalesciente

ELISA for HIV antibody

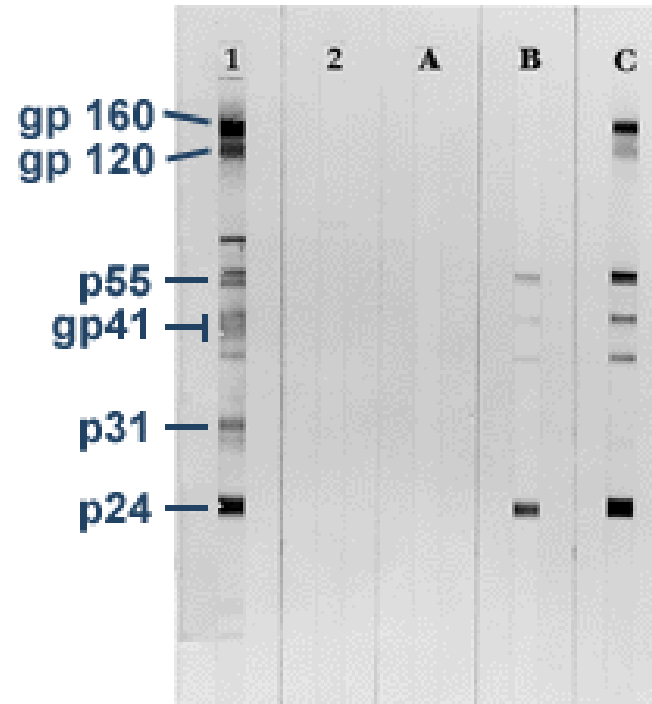


Microplate ELISA for HIV antibody: coloured wells indicate reactivity

Western Blot

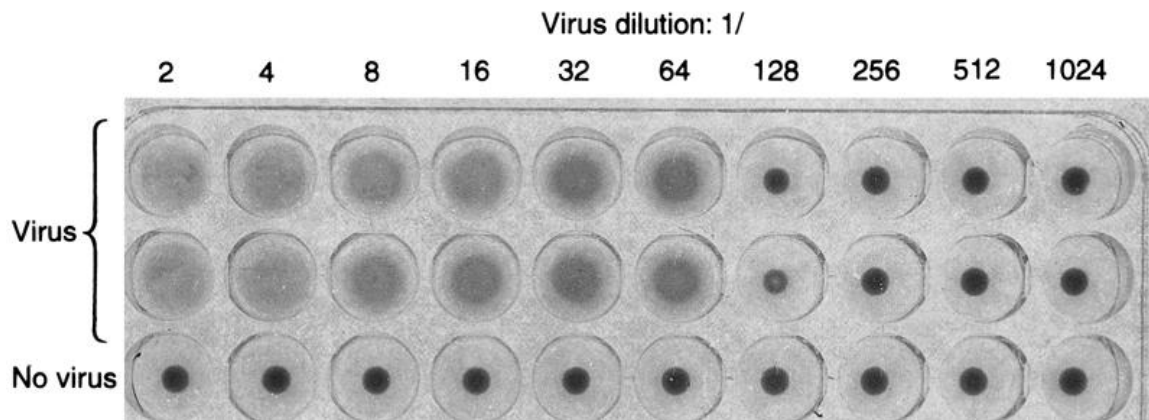
HIV-1 Western Blot

- Lane 1: Positive Control
- Lane 2: Negative Control
- Sample A: Negative
- Sample B: Indeterminate
- Sample C: Positive

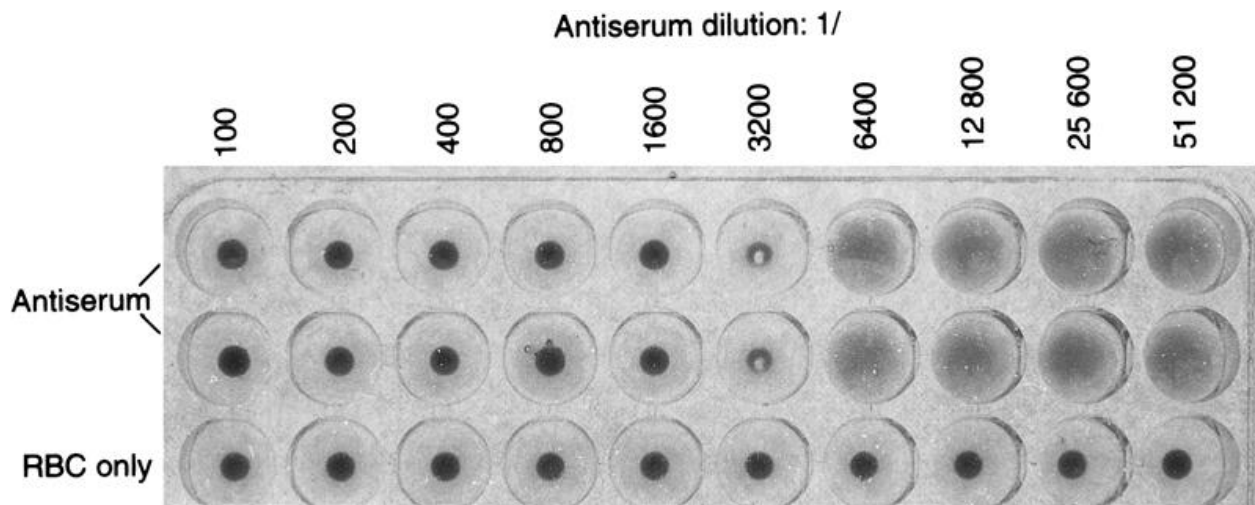


Serología

Hemaglutinación



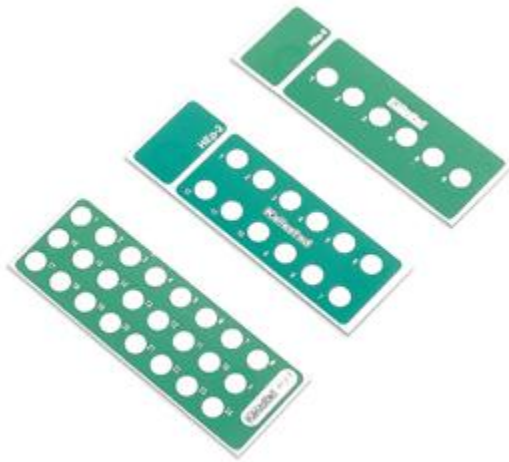
Inhibición de la Hemaglutinación



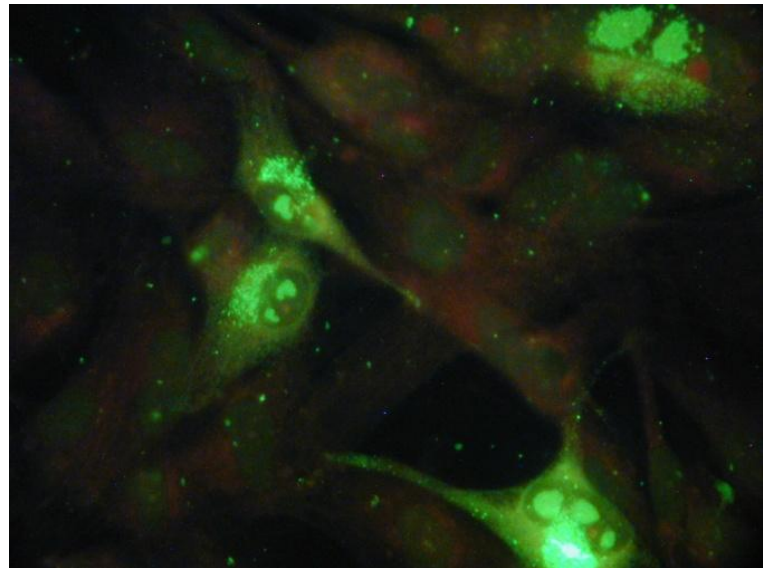
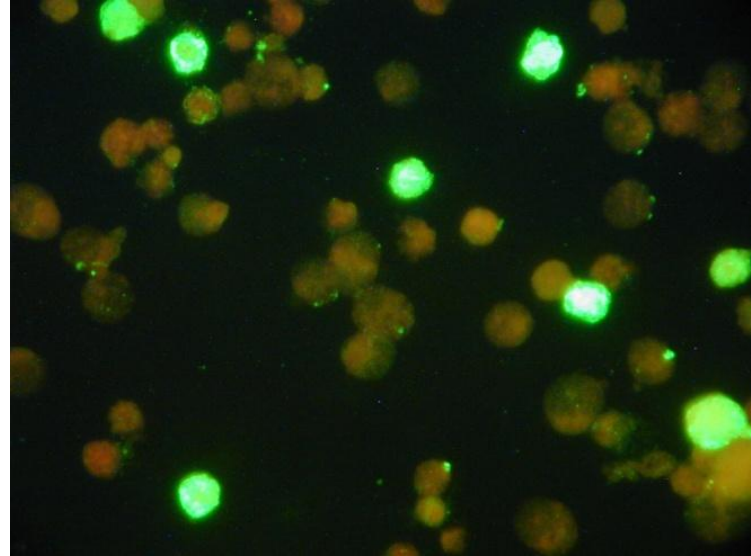
Serología

Inmunofluorescencia

EBV



CMV



Utilidad de los resultados serológicos

- Depende del virus particular de que se trate.
- Por ej. Para rubeola y hepatitis A, el comienzo de los síntomas coincide con el desarrollo de anticuerpos por lo que la detección de IgM o cuadruplicación de títulos de IgG indicaría enfermedad activa.
- Otros virus producen enfermedad clínica antes de la aparición de anticuerpos. Por ej virus de enf. diarreicas y respiratorias. En estos casos el diagnóstico serológico es retrospectivo y no tan útil.
- En otros casos los virus pueden producir enfermedad clínica meses o años luego de la seroconversión. Ej. HIV, rabia. En estos casos los anticuerpos son diagnóstico definitivo.

Problemas de la serología

- Largo período para obtener los sueros pareados agudo/convalescente.
- Infecciones suaves o locales con respuesta humoral baja o indetectable. Ej Herpes genitalis
- Cross-reactividad entre virus relacionados (HSV y VZV, Japanese B encephalitis y Dengue).
- Pacientes inmunocomprometidos pueden dar respuesta reducida o ausente.
- Falsos positivos en pacientes con mononucleosis infecciosa o autoinmunes (SLE, etc).
- Falsos positivos en pacientes recibiendo sangre o productos de sangre por transferencia de acs.

Tipos de muestras

Clinical Category	Blood	Throat swab	Faeces	CSF	Other
1. Meningitis	+	+	+	+	
2. Encephalitis	+	+	+	+	Brain biopsy
3. Paralytic disease	+	+	+	+	
4. Respiratory illness	+	+			Nasopharyngeal aspirate
5. Hepatitis	+				
6. Gastroenteritis			+		
7. Congenital diseases	+				Urine, saliva
8. Skin lesions	+		+		Lesion sample e.g. vesicle fluid, skin scrapping
9. Eye lesions					Eye swab
10. Myocarditis	+				Pericardial fluid
11. Myositis	+		+		
12. Glandular fever	+				
13. Post Mortem	+				Autopsy

After use, swabs should be broken into a small bottle containing 2 ml of virus transport medium. Swabs should be sent to the laboratory as soon as possible without freezing. Faeces, CSF, biopsy or autopsy specimens should be put into a dry sterile container.

Métodos Moleculares

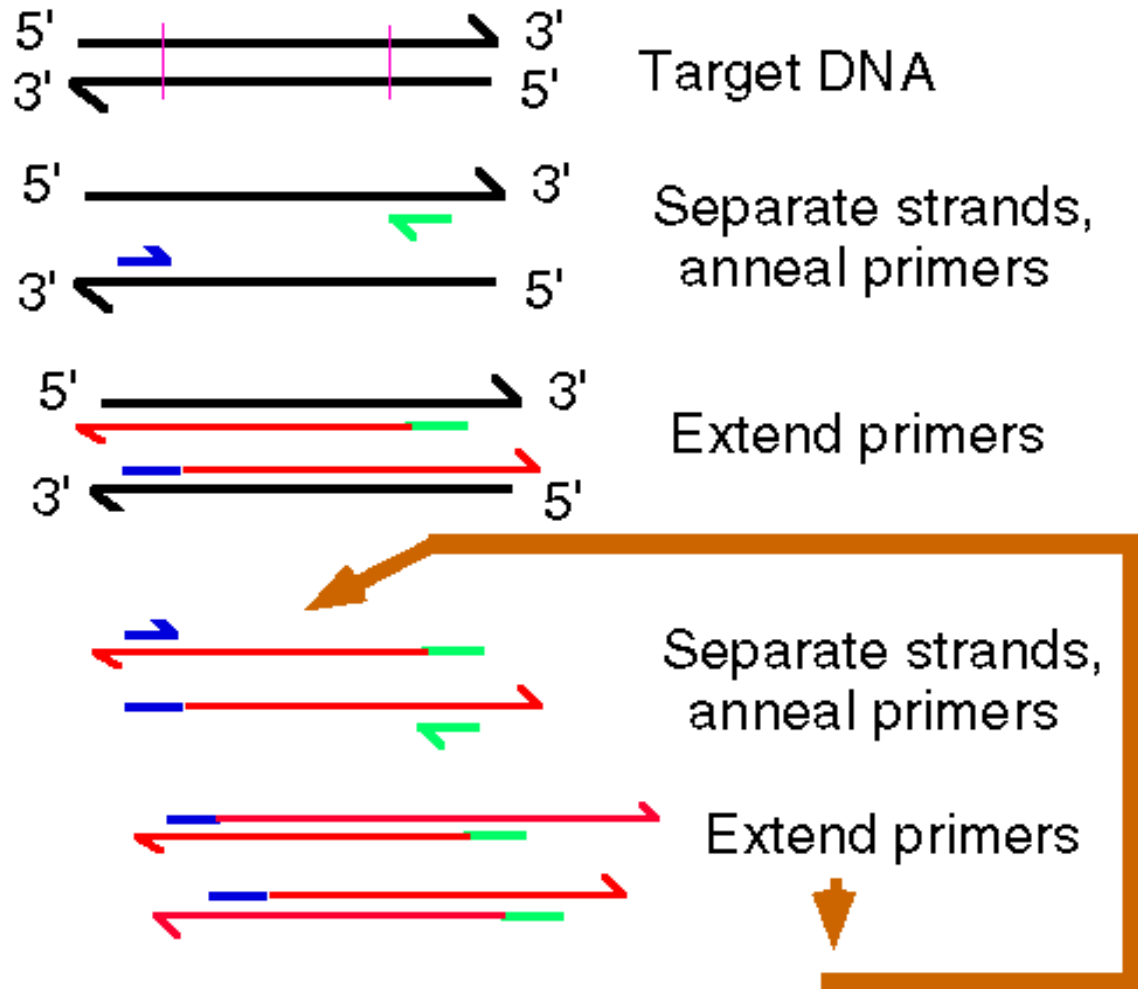
Técnicas clásicas

- Dot-blot, Southern blot, in-situ hybridization. (uso de sondas específicas)
- La especificidad depende de las condiciones de hibridización. La sensibilidad no suele ser mejor que los métodos convencionales.
- No fueron tan ampliamente usados por ser caros y tediosos.

Polymerase Chain Reaction

- **Advantages of PCR:**
 - Extremely high sensitivity, may detect down to one viral genome per sample volume
 - Easy to set up
 - Fast turnaround time
- **Disadvantages of PCR**
 - Extremely liable to contamination
 - High degree of operator skill required
 - Not easy to set up a quantitative assay.
 - A positive result may be difficult to interpret, especially with latent viruses such as CMV, where any seropositive person will have virus present in their blood irrespective whether they have disease or not.
- These problems were addressed by the arrival of commercial closed systems such as the Roche Cobas Amplicor which requires minimum handling. The use of synthetic internal competitive targets in these commercial assays has facilitated the accurate quantification of results. However, these assays are very expensive.

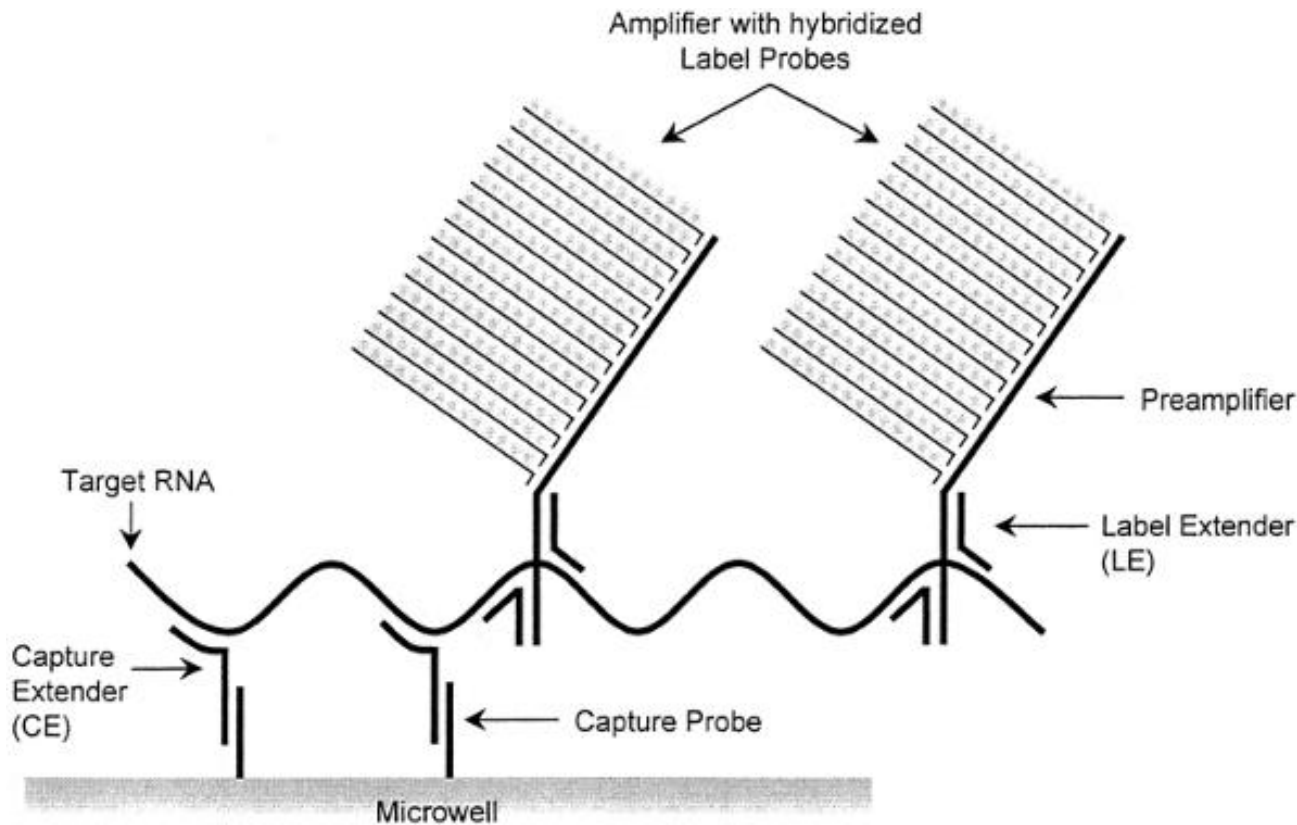
Schematic of PCR



Each cycle doubles the copy number of the target

Otras técnicas de amplificación

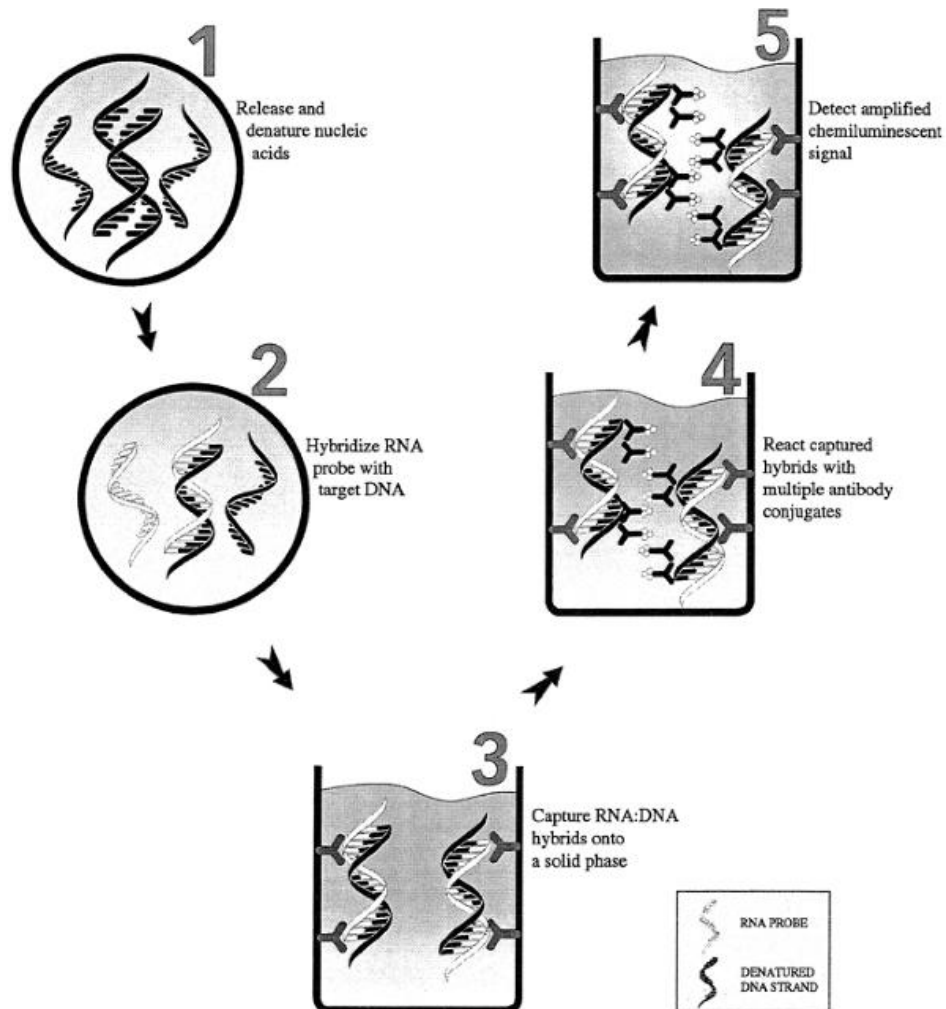
Amplificación de señal



Branched DNA

Otras técnicas de amplificación

Amplificación de señal



Captura del híbrido

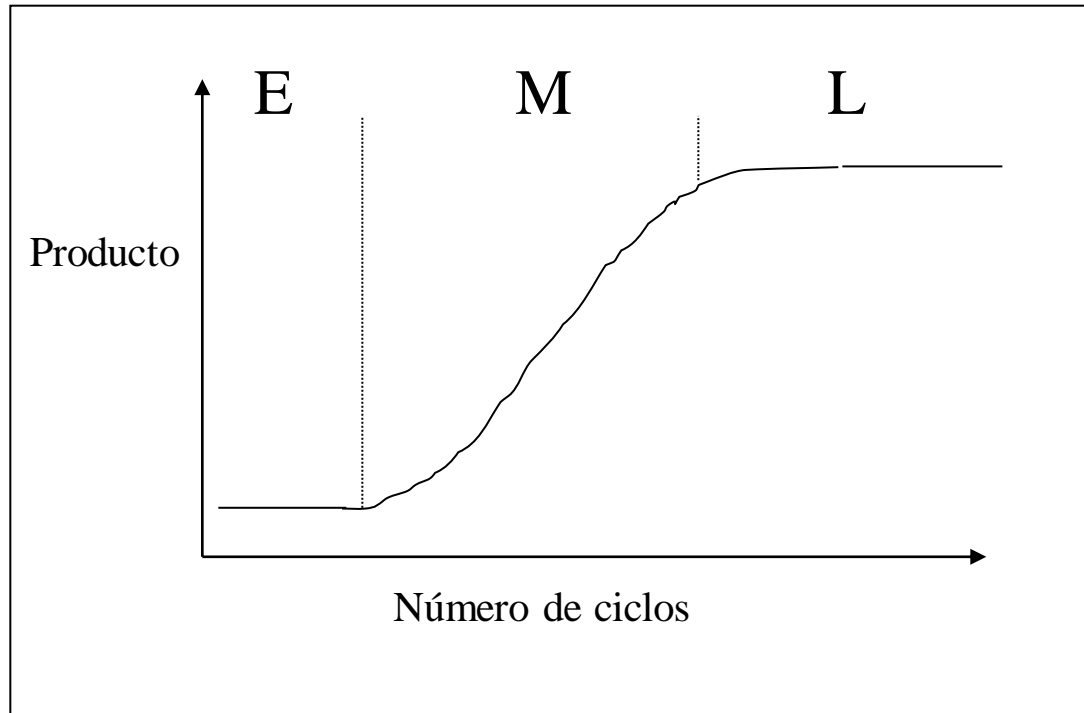
PCR en Tiempo Real

Esta basado en:

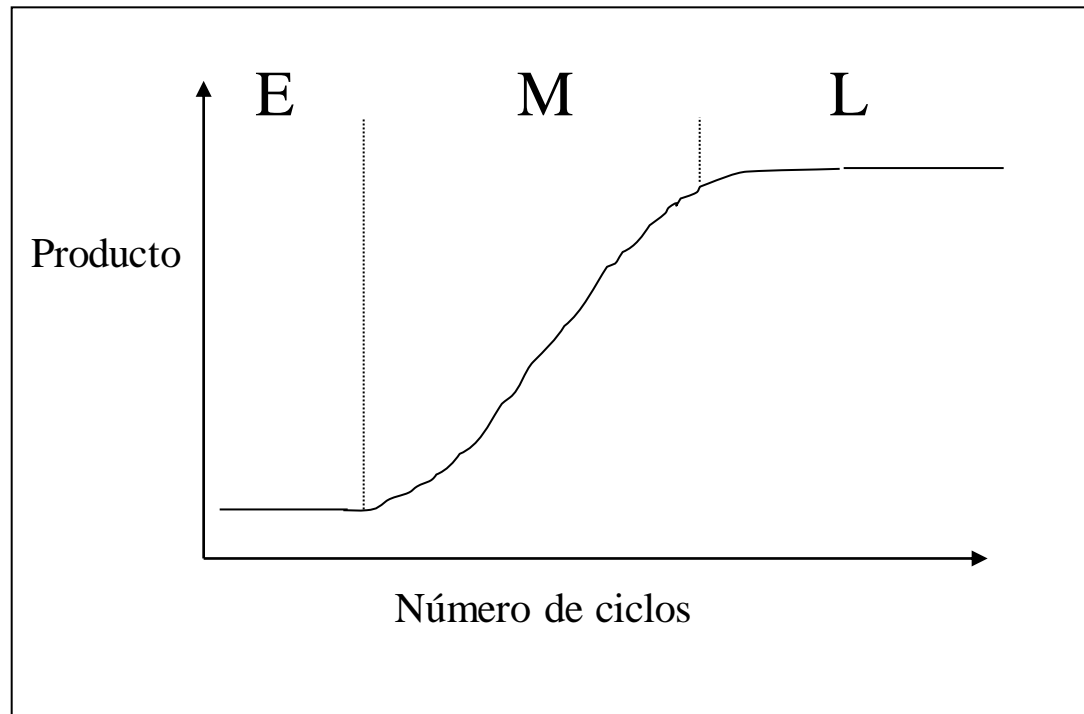
- la detección y cuantificación de un reporter fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción.

PCR en Tiempo Real

Los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR



PCR en Tiempo Real



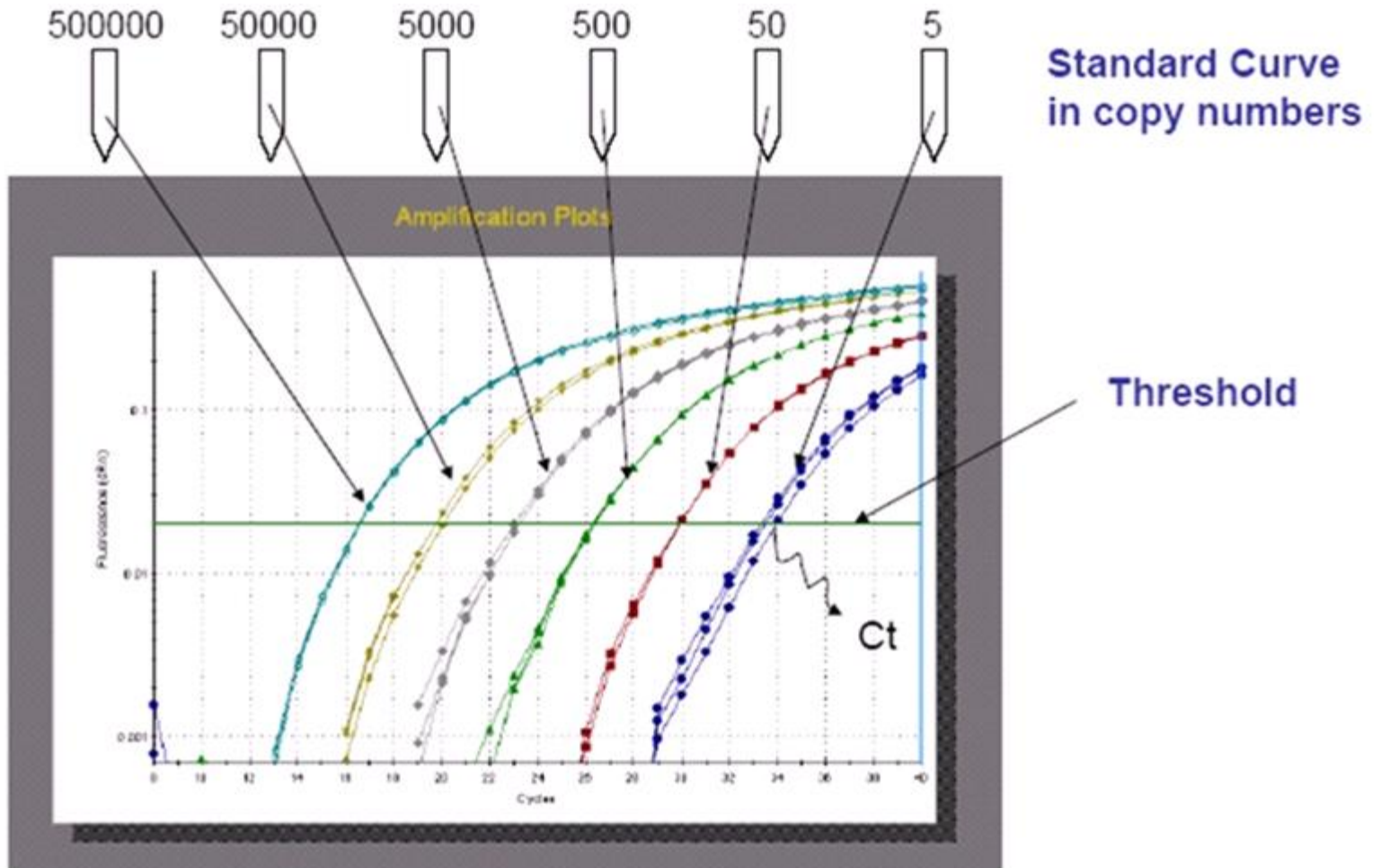
Luego de n ciclos, se obtienen 2^n moléculas de ADN doble cadena.

E: fase temprana (barrido del primer)

M: fase media (acumulación exponencial del producto)

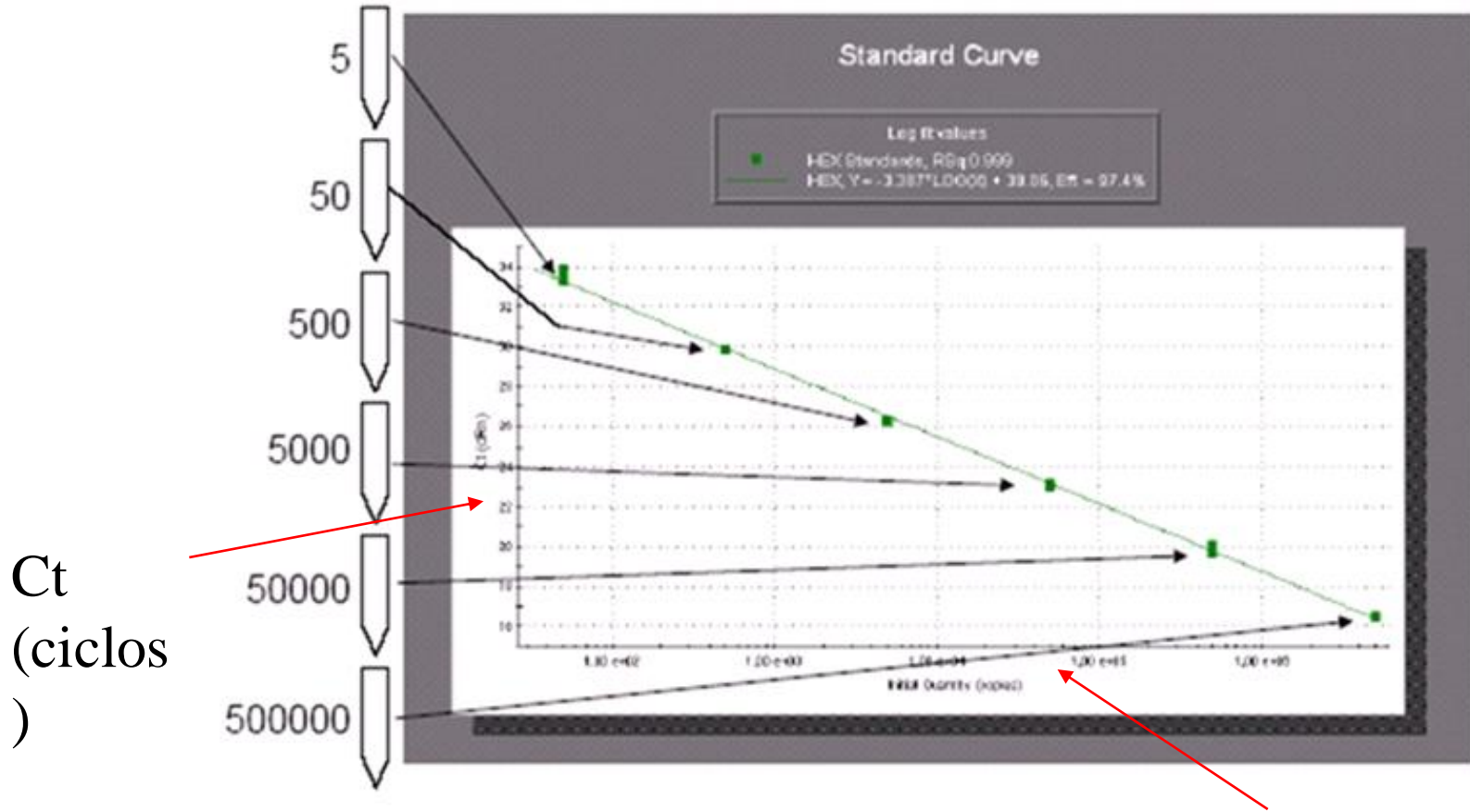
L: fase tardía (acumulación de producto subóptima)

CURVA ESTANDAR



CURVA ESTANDAR

Standard Curve
in copy numbers



Ct
(ciclos
)

CONCENTRACION
(LOG)

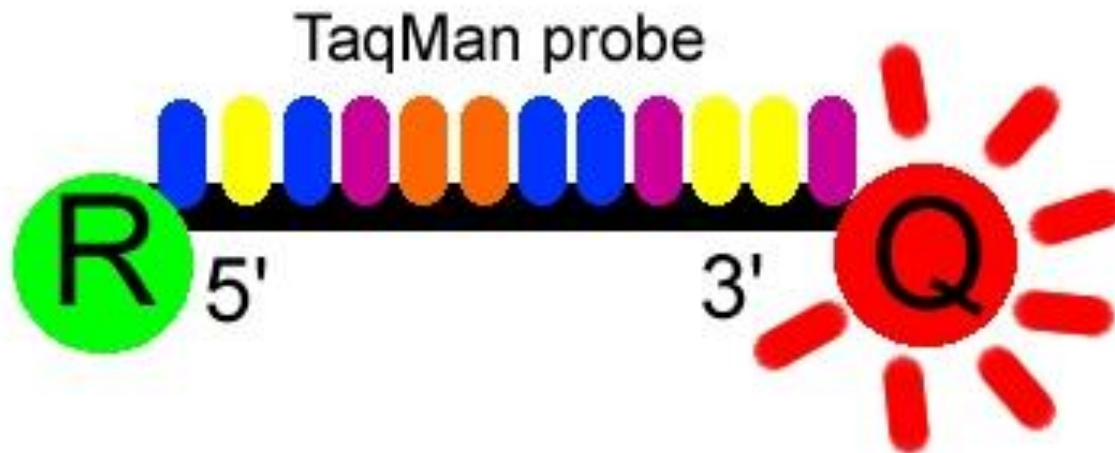
PCR en Tiempo Real para Carga Viral

- **COBAS TaqMan HIV-1 Test**
- Lab Roche
- Rango dinámico: 40-10 millones cps/ml

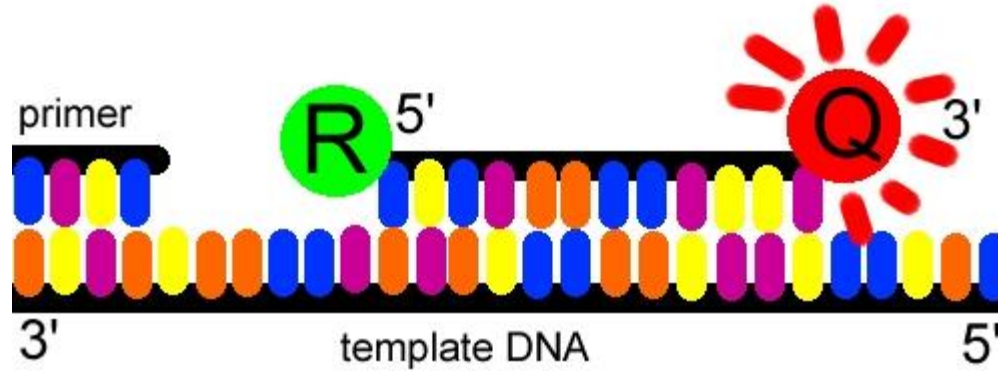
PCR en Tiempo Real

Método TaqMan ó 5'Nucleasa

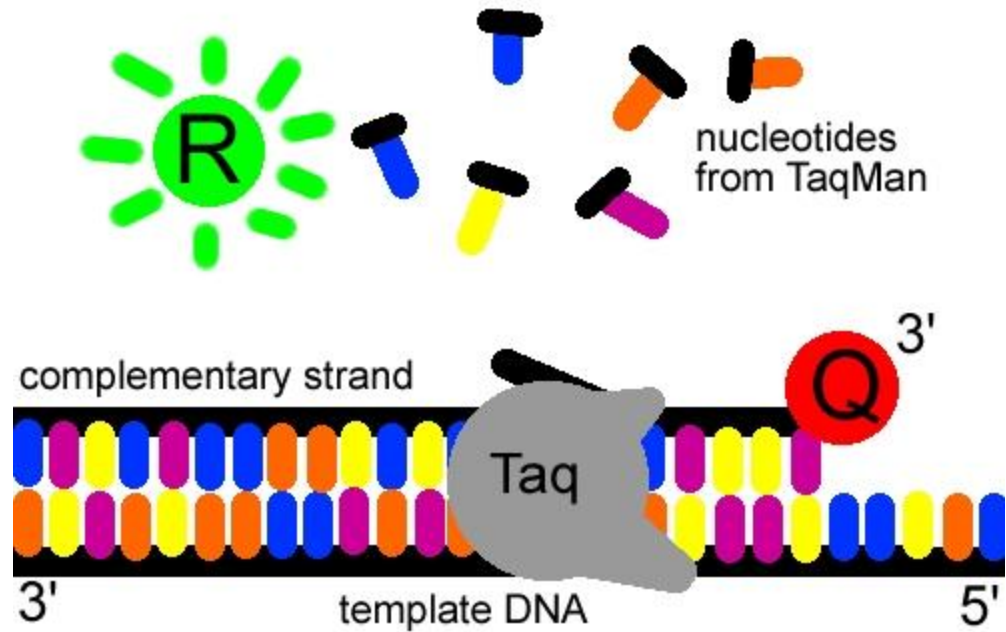
- DISEÑO DE LA SONDA TAQMAN



Pegado de la sonda TaqMan



Liberación del reporter



NASBA en Tiempo Real para Carga Viral

- **NucliSens EasyQ HIV-1**
- Lab BioMerieux
- Rango dinámico: 50- 3 millones cps/ml

NASBA: Real Time

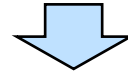
1. Liberación de ácidos nucleicos. Muestra clínica + Buffer de Lisis



2. Extracción. Unión de ácidos nucleicos a partículas de sílica
Control extraído junto con la muestra



3. Amplificación. NASBA

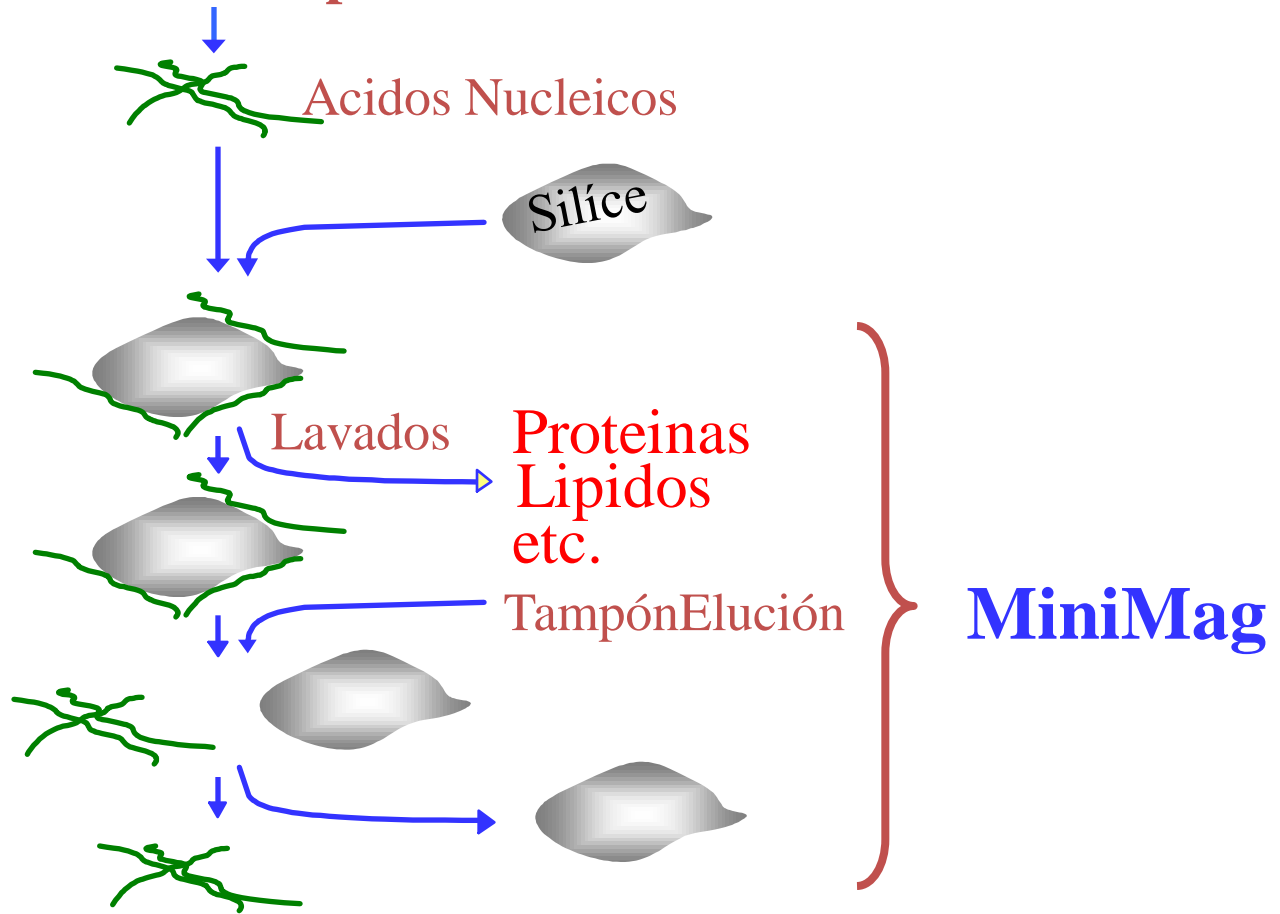


4. Detección por molecular beacons

En un solo paso

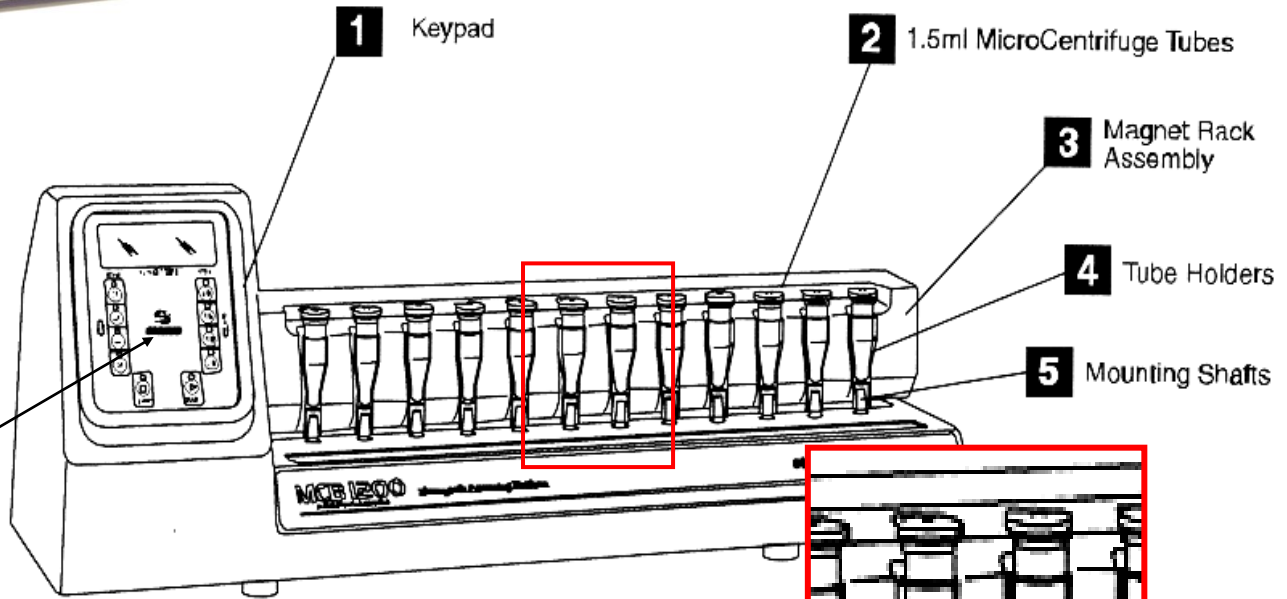
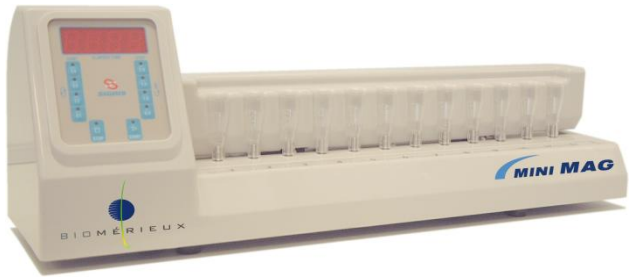
EXTRACCIÓN de BOOM

Muestra + Tampón Lisis



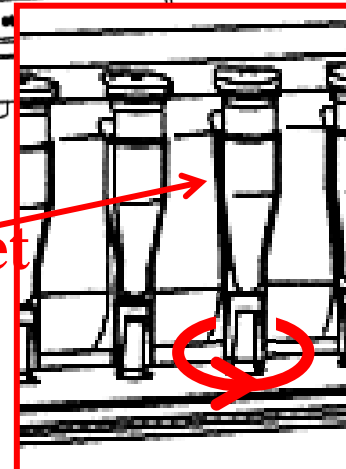
Acido Nucleico Purificado

MiniMAG



- Step 1
- start
- 30 sec
- stop

Magnet



NASBA - REACCION

Combina la acción de tres enzimas:

- Transcriptasa Reversa (AMV-RT):
Síntesis de ADN a partir de ARN o ADN dianas



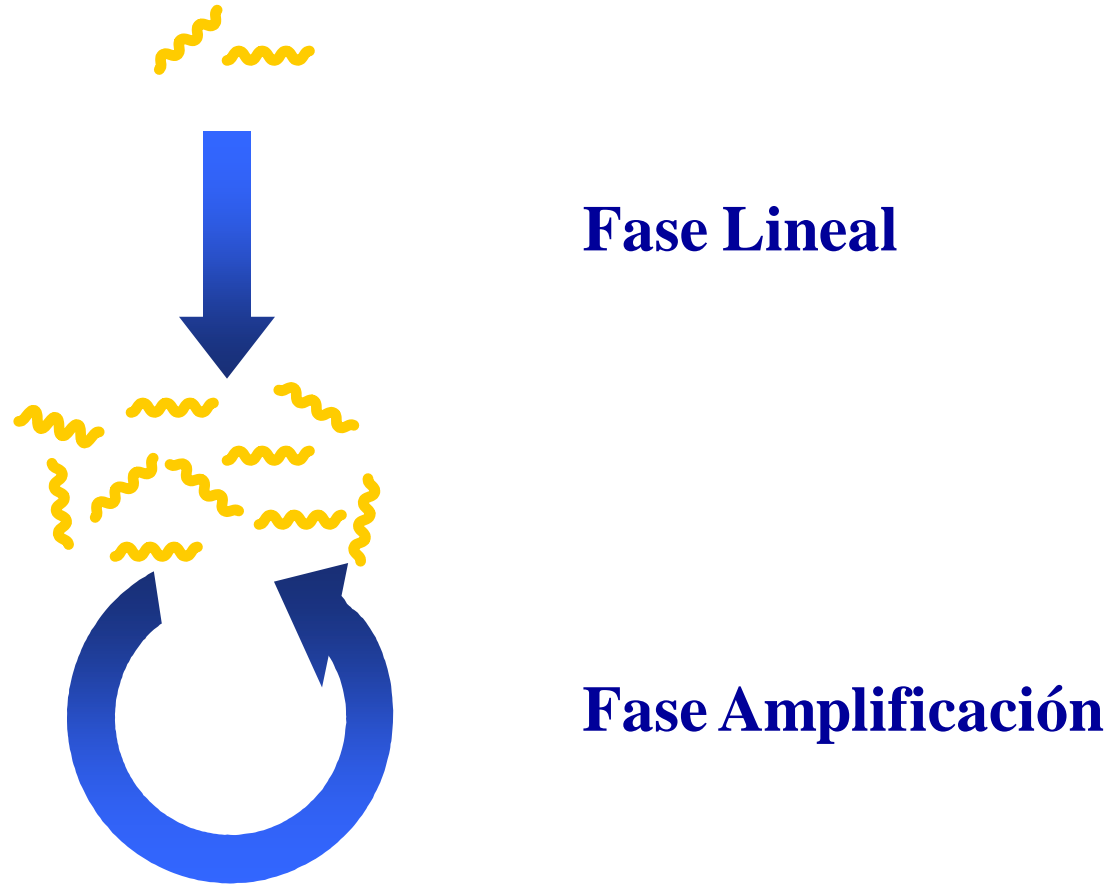
- RNasa H:
Degradación de ARN hibridado con ADN



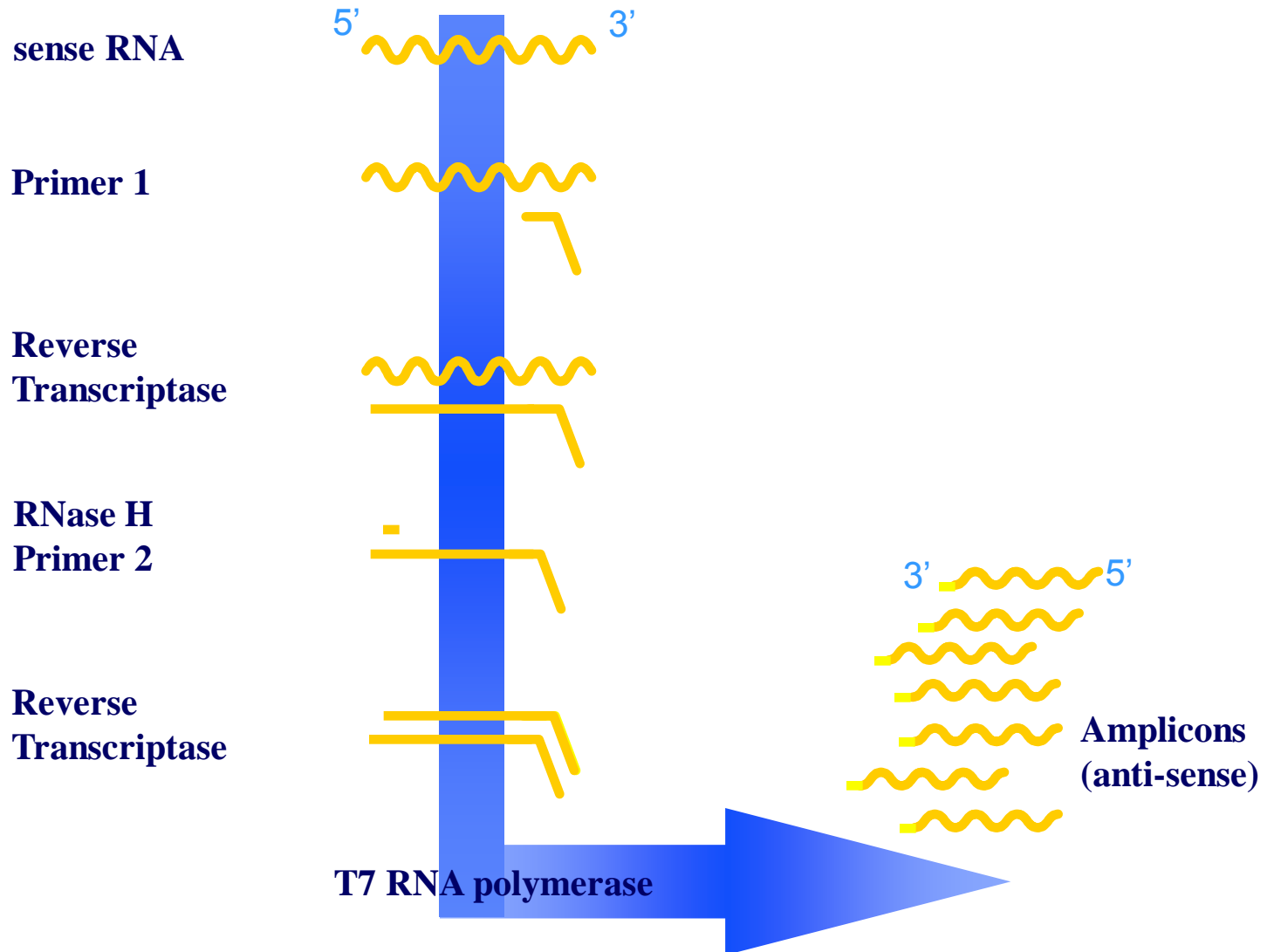
- T₇ RNA polymerasa
Síntesis de ARN a partir de DNA diana
(contiene T₇ promotor)



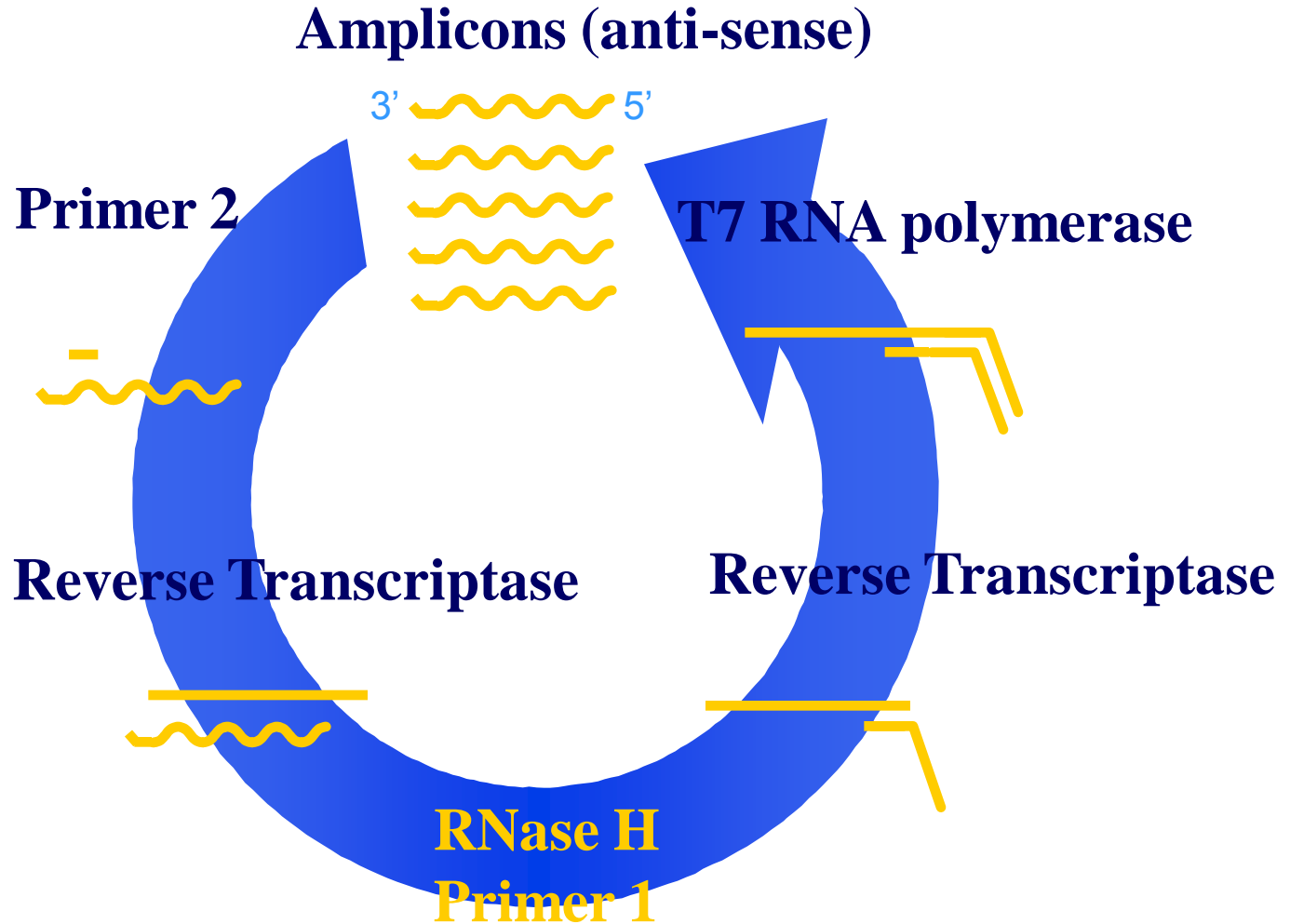
NASBA - AMPLIFICACION



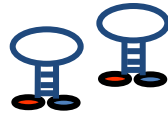
NASBA: Fase Lineal



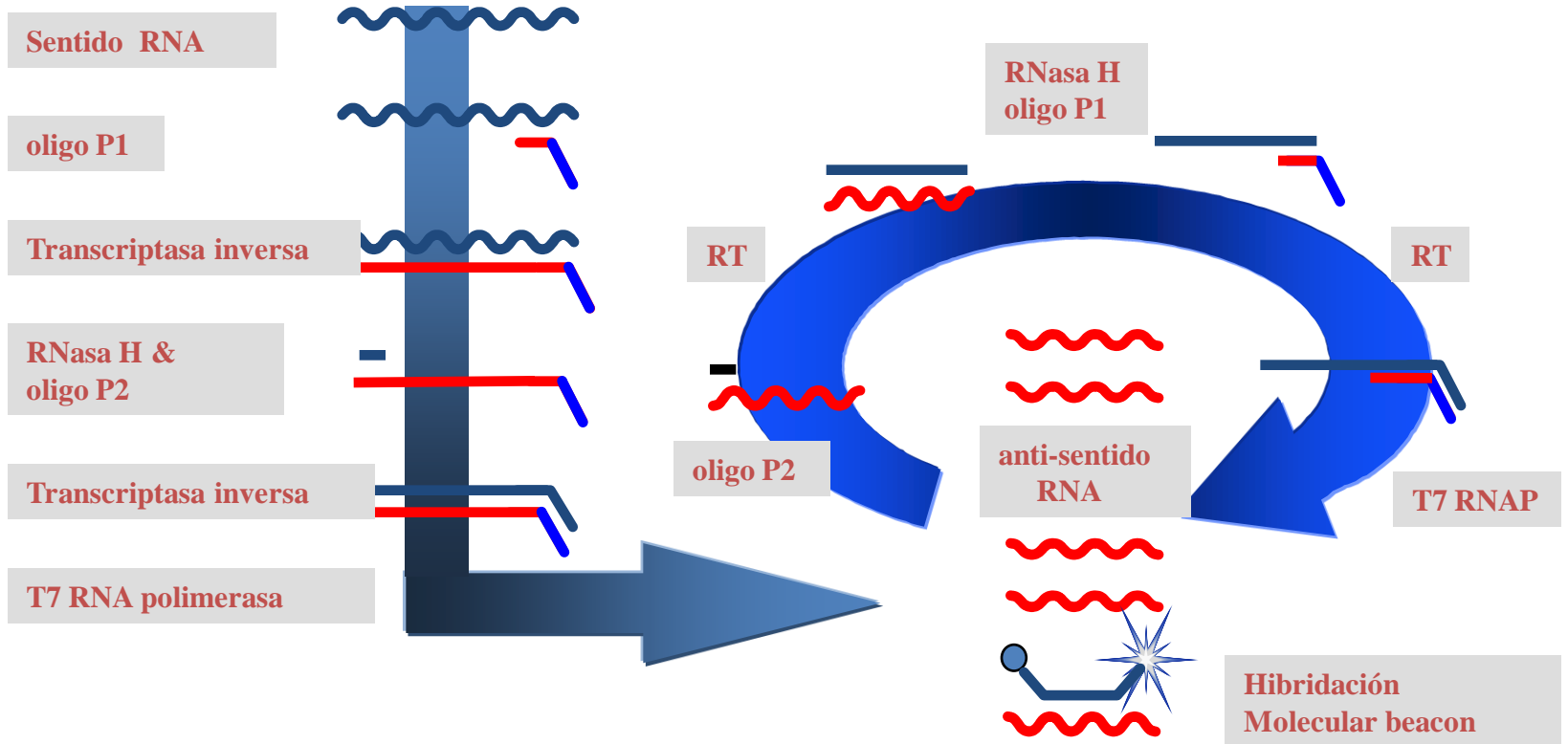
NASBA: Fase Amplificación



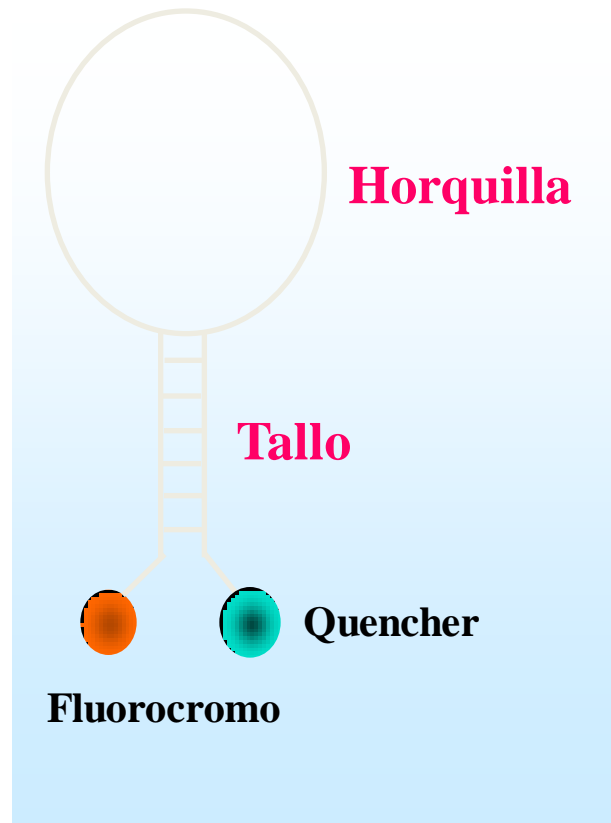
Detección NASBA RT



Diana específica molecular beacon



¿ Qué son las Molecular Beacons?



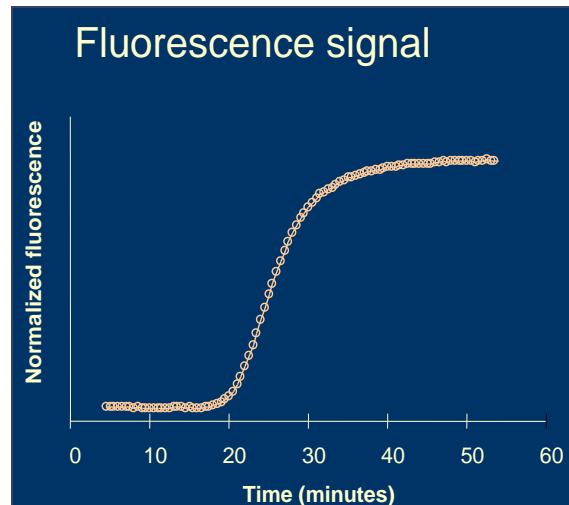
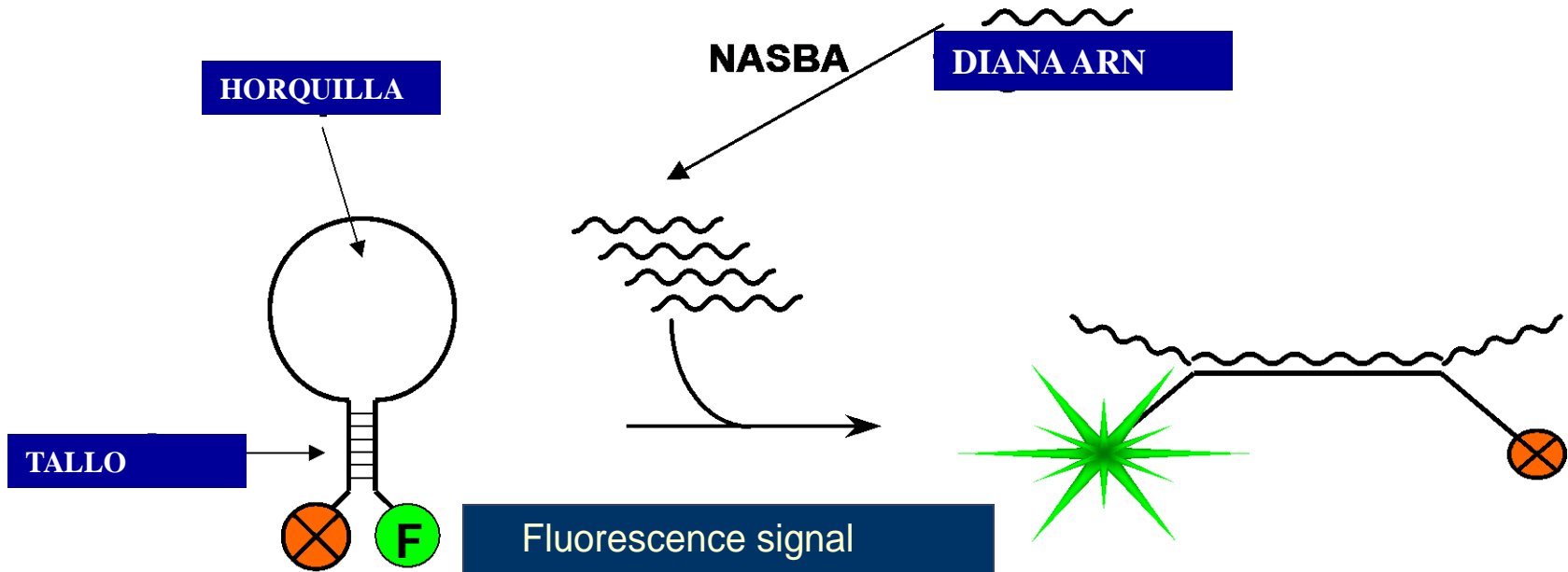
Sondas de DNA con una estructura tallo-horquilla y dos extremos modificados

Horquilla con secuencia de 20-25 complementaria a la secuencia diana para hibridación

6-7 pares de bases en la secuencia del tallo

Marcadores diferentes para diferentes dianas (WT y calibrador)

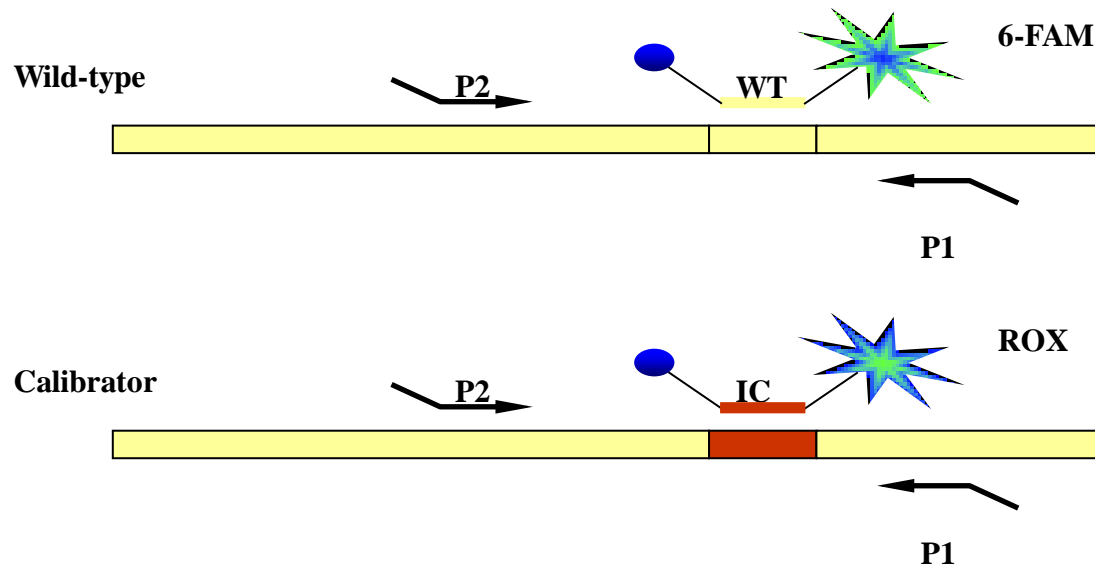
Modo de Acción



Calibrador interno

Que es un calibrador interno?

- Oligonucleotido
- Misma secuencia que el WT para el pegado del primer.
 - Secuencia diferente en la region de detección.



Ventajas de usar una Calibración Interna

- **Variación en el rendimiento de la extracción afectan tanto al calibrador como la muestra**
- **Componentes inhibidores de Amplificación afectan a WT y calibrador de igual forma**

Analizador NucliSens EasyQ



LECTOR-INCUBADOR Y COMPUTADORA