

VIROLOGIA: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E VÍRUS DNA



27. Março. 2007

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial em **Virologia** baseia-se nas seguintes técnicas:

- Citologia e Histologia;
- Cultura de células;
- Microscopia electrónica;
- Detecção de proteínas víricas (nomeadamente pesquisa de enzimas e antígenos víricos);
- Detecção de genomas víricos;
- Serologia (pesquisa de uma resposta imunológica do hospedeiro perante as partículas víricas).

Vamos agora conhecer cada uma destas técnicas e saber em que situação (em que viroses) é são usadas para o diagnóstico laboratorial de uma infecção vírica.

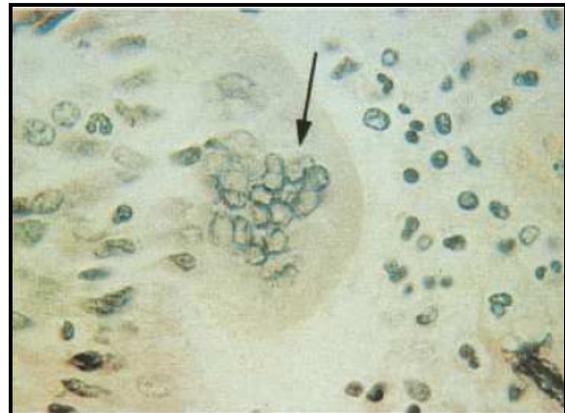
Citologia e Histologia

A **citologia e a histologia** têm uma utilidade muito importante em muitas infecções víricas. O efeito citopático dá-nos de imediato a ideia de uma infecção vírica.

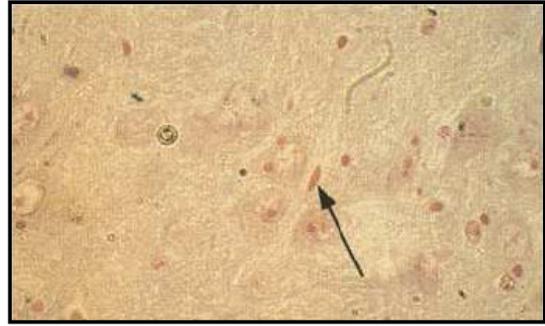
Efeito citopático: nome atribuído a todas as alterações celulares que o vírus provoca ao entrar na célula.

O efeito citopático é demonstrado nesta imagem, com a presença de uma célula gigante multinucleada, resultante da fusão de várias células infectadas por um vírus, aquilo a que chamamos **sincício**.

Esta imagem indica-nos a presença de uma infecção vírica; porém, não discrimina que vírus é especificamente. Diz-nos que é uma infecção vírica, não outro tipo de infecção, mas vários vírus têm capacidade de provocar este efeito citopático, por exemplo vírus representados pelo *Herpes simplex*, *Varicella-zoster*, *Paramixovírus*, *VIH*. Este efeito citopático para estes vírus é mais evidente.



A presença histológica de alguns **corpos de inclusão** é também um efeito citopático (ver na imagem). A imagem apresenta tecido cerebral com presença de corpos de inclusão corados pelo Gram e chamados **corpos negri**, típicos do *vírus da raiva*. A presença destes corpos na sequência de uma infecção por este vírus dá-nos o diagnóstico etiológico.



Cultura de Células

A cultura de célula é, para a maioria dos vírus, o método standard/ padrão para a qual fazemos um diagnóstico de infecção vírica. Consegue indicar, na maioria dos casos, não em todos, qual o tipo de vírus que está implicado na infecção.

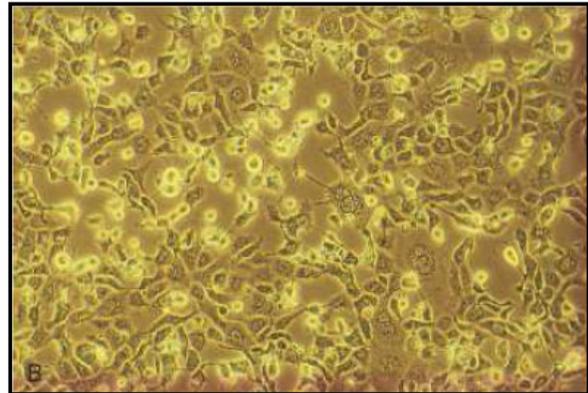
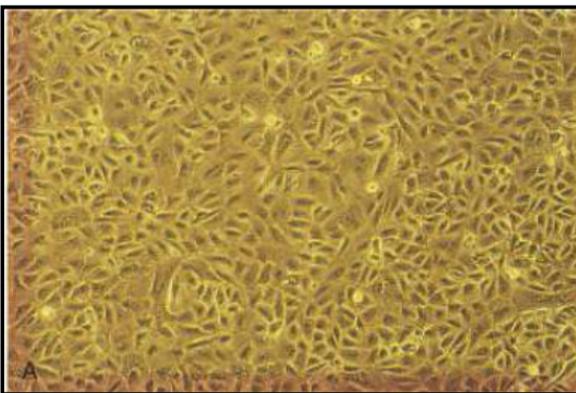
A cultura celular divide-se, de uma forma simplista, em **cultura de células convencional** e **shell vial**, também chamado "*glass tube*", um tubo cilíndrico de vidro (que, segundo a professora, teremos a oportunidade de ver nas aulas práticas).

Cultura de células convencional

- A cultura de células convencional requer: linha celular (células) + meio de cultura + antimicrobianos
- Pesquisa do efeito citopático em 1 a várias semanas.

Há várias **linhas celulares** que já estão estudadas para determinados vírus (células renais de macaco, células epiteliais de neoplasias cutâneas, células fetais humanas). Cultivam-se estas células num **meio de cultura** adequado, no qual vamos injectar as secreções, o sangue... a amostra clínica do doente que suspeitamos ter uma infecção vírica.

Ao fim de uma a duas semanas, vamos estudar estas células e procurar os efeitos víricos, líticos e outros, que teve a entrada desse material infectado pelo vírus na linha celular. A pesquisa é feita pelo efeito citopático em uma a várias semanas. Isto implica que, para um diagnóstico definitivo de uma infecção vírica usando cultura de células convencional, seja necessário esperar no mínimo uma semana para ter um resultado. Isto é, perante um doente com uma suspeita de uma infecção vírica só é possível ter certeza usando este teste uma semana depois, no mínimo (muitas vezes é preciso mais tempo). Deste modo, mais recentemente, foi criado o **shell-vial**.



Os **efeitos citopáticos** procurados numa **cultura de célula convencional** estão aqui resumidos:

▪ **MORTE CELULAR**

- Células arredondadas;
- Degeneração;
- Agregação;
- Perda de adesão à lâmina de cultura (os vírus são agentes intracelulares obrigatórios, que levam a alterações das células. Estas ficam arredondadas, agregam-se e perdem a adesão à lâmina de cultura).

▪ **ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS CARACTERÍSTICAS**

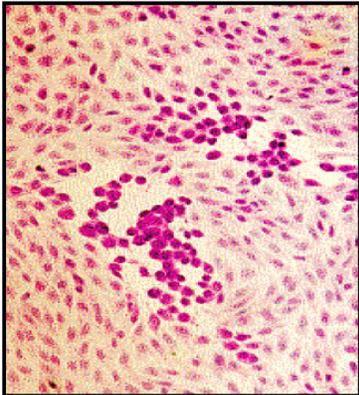
- Corpos de inclusão (ex: vírus da raiva);
- Cromatina periférica;
- Sincícios (células multinucleadas resultantes da fusão das células induzida pelo vírus, isto é, uma vez sendo infectadas pelo vírus, as células perdem a identidade própria, juntam-se umas às outras, tornando-se grandes e vacuolizadas).

▪ **ALTERAÇÕES NA SUPERFÍCIE CELULAR**

- Expressão de antigénios;
É por alterações na superfície celular da expressão de antigénios que se usam técnicas de imunofluorescência directa e a técnica imunoenzimática para se ver a presença ou não desses antigénios que são específicos para cada vírus.
- Hemadsorção (expressão das hemoaglutininas).
Muitos vírus possuem, no seu invólucro, glicoproteínas específicas, sendo algumas delas hemoaglutininas, que constituem local de adesão dos eritrócitos, promovendo a sua agregação. Logo, a agregação dos eritrócitos diz-nos que aquele vírus possui hemoaglutininas. Como as hemoaglutininas só existem em alguns vírus, podem-se ir eliminando hipóteses.

Atentem nas seguintes imagens.

Aqui representado o efeito citopático nestas células promovido por um *enterovírus*, numa cultura celular de células renais de macaco.

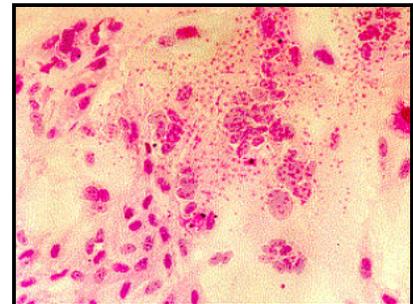


Nesta imagem observam-se, em grande ampliação, os **sincícios**, isto é, células gigantes multinucleadas.



Hemoadsorção:

Adição de meios de cultura de eritrócitos na pesquisa de glicoproteínas do tipo hemaglutininas. As hemaglutininas estão presentes nos seguintes vírus: *vírus influenza*, *parainfluenza*, *sarampo*, *togavírus*. Ocorre, portanto, agregação de glóbulos rubros, observável na imagem.



Shell-vial

O **shell-vial** combina cultura celular com técnicas imunológicas.

Além de promover a entrada do vírus na célula, procede-se posteriormente à pesquisa das células infectadas, utilizando a imunofluorescência directa, determinado tipo de anticorpos para antígenos de determinados vírus e, se positivo, existe esse vírus.

Quando se faz um **diagnóstico laboratorial de vírus**, tem que se partir de um pressuposto de uma determinada infecção vírica mais provável.

Ao contrário das bactérias, para as quais se pode usar um meio onde todas podem crescer e depois diferencia-se para identificar a bactéria, para os vírus é necessário usar os antígenos específicos para um vírus, se negativo tem que se fazer para outro, se negativo faz-se para outro... Logo, para se fazer tantos quanto necessário, o clínico tem que ter a ideia de quais são os mais prováveis. Só se chega a um diagnóstico clínico e laboratorial de uma virose se o clínico, quando vê o doente, levanta a hipótese de um determinado número de famílias de vírus possíveis e são essas as testadas e não a "enormidade" de todos os vírus. É a junção da clínica com o laboratório que permite chegar a um diagnóstico.

- células coradas com Atc anti-vírus;
- detecção mais precoce que o efeito citopático;
- maioria detectável em 24h.

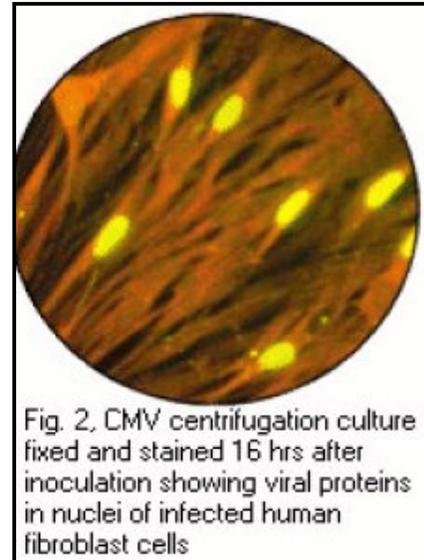


Fig. 2. CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

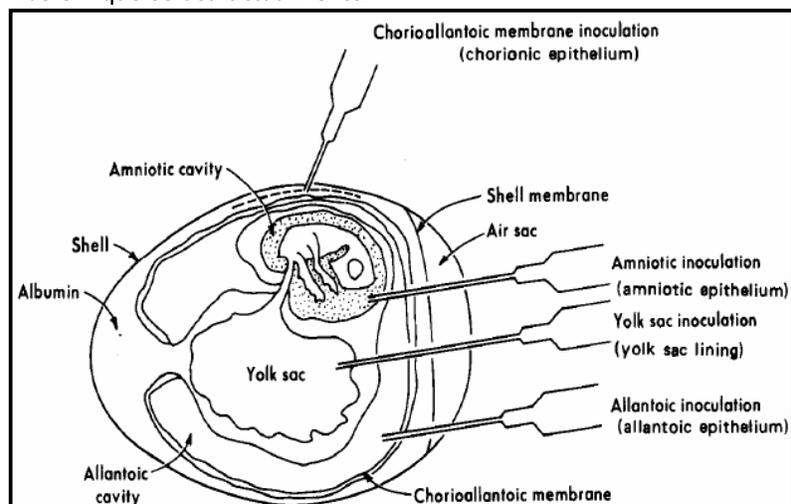
O **shell-vial** usa apenas uma camada muito fina de células na parte final do tubo, à qual se inocula a amostra clínica suspeita de infecção. Simultaneamente à técnica de cultura de células, junta-se a técnica imunológica, em que se marcam as células infectadas pelo vírus, sendo a deteccção mais precoce do que esperar pelo efeito citopático. Resultados podem ser obtidos ao fim de um dia. Trata-se de um método mais precoce, de sensibilidade e especificidade elevadas e é utilizado hoje em dia com maior interesse clínico que a cultura convencional.

"A cultura de células aqui representada é de células diferentes." Está estudado que determinados tipos de células são usadas para o estudo de determinados vírus. Por exemplo, as células epiteliais são usadas para o estudo do vírus Herpes, as células de macaco para Adenovírus. Há, portanto, especificidade.

Cultura em ovo embrionado

A cultura em ovo embrionado foi ultrapassada pelas culturas de células entretanto desenvolvidas, era mais usada antigamente. Há poucos vírus em que se usa actualmente.

Como se vê na imagem, os locais de inoculação da amostra clínica presumivelmente infectada pelo vírus vai desde o epitélio coriônico até ao amniótico ou mesmo o saco vitelino. É nestes tecidos que depois se retiram amostras para ver o tal efeito citopático. É um processo mais moroso, implica técnicas especiais e só é necessário para muito poucos vírus, neste momento, e em que não foram desenvolvidas linhas celulares para a sua cultura.



Microscopia Electrónica

A **microscopia electrónica (ME)** e a **imunomicroscopia electrónica** só muito raramente são usadas para um diagnóstico na prática clínica. São técnicas caras, morosas e que, portanto, são quase só destinadas à investigação. Não é, portanto, uma técnica de referência na prática clínica.

A **imunomicroscopia electrónica** é uma técnica que tenta aumentar a acuidade da ME. Porquê? Porque se as partículas víricas forem poucas no tecido ou na amostra, podemos estar muito tempo a procurá-las, já que a ME aumenta imenso o espaço e a partícula vírica pode nunca ser encontrada, apesar de lá estar.

Na imunomicroscopia, marca-se com o antígeno um determinado vírus (um anticorpo para um antígeno vírico) e, assim, é mais fácil com a ME procurar esse anticorpo que se ligou a um antígeno vírico e direccionar-se para a área que possa estar infectada.

São as características morfológicas que nos permitem fazer um diagnóstico em ME de um tipo de vírus. No entanto, para alguns vírus, a ME não é capaz de diferenciar, por exemplo, dentro de uma grande família.

Deteccção de Proteínas Víricas

O diagnóstico na deteção de partículas víricas está muito bem desenvolvido. Para muitos vírus baseamo-nos neste diagnóstico.

Podemos detectar **antígenos víricos** pelos seguintes métodos:

- ELISA;
- Imunofluorescência (directa e indirecta);
- Western blot (aumenta a sua sensibilidade e especificidade, apesar de ser mais caro).

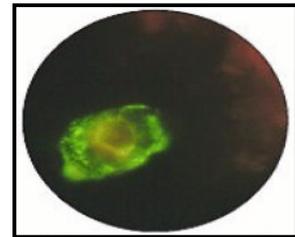
A pesquisa de **enzimas** é feita por:

- Electroforese;
- Actividade transcriptase inversa (pode ser pesquisada através de determinadas técnicas laboratoriais para determinados vírus).

Pesquisa de antígenos – Imunofluorescência directa:

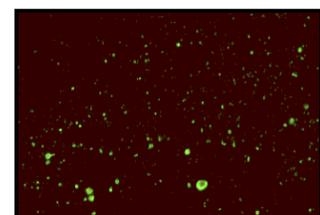
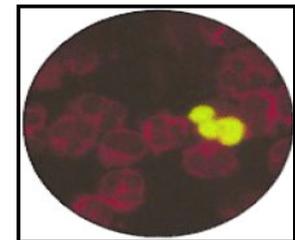
*** Positividade para a presença do vírus Herpes.**

Pesquisa de antígenos por imunofluorescência directa na suspeita de uma infecção por Herpes nesta célula epitelial, com resultado positivo: anticorpo adicionado ligou-se ao antígeno vírico.



*** Positividade para antígeno do vírus citomegálico.**

Imagem de uma amostra clínica, podendo ser de um exsudado de uma lesão vesiculosa, por exemplo.



Detecção de Genomas Víricos

A detecção de genomas víricos foi desenvolvida na última década e aumentou a especificidade de todas estas técnicas.

- PCR;
- PCR transcriptase inversa (RT_PCR);
- PCR real-time (carga vírica);
- Southern, Northern blots.

Para algumas infecções, nomeadamente para o HIV, estas técnicas vêm eliminar quase definitivamente a presença de falsos positivos e falsos negativos para a infecção por HIV (*"e mesmo a detecção dessa infecção através de antígeno e não de anticorpos"*).

Serologia

A serologia baseia-se na resposta humoral do hospedeiro. Procuramos o **tipo de anticorpo** presente no hospedeiro, se são anticorpos do tipo IgG ou IgM e qual o **título**, isto é, quantificamos esses anticorpos para estudar esse tipo de infecção. A serologia tem imensos viéses, imensos falsos positivos e negativos para algumas infecções.

Têm sido utilizadas técnicas mais sensíveis e mais específicas, mas muitas vezes a interpretação destes resultados da resposta humoral do hospedeiro é muito complicada e não dá um diagnóstico definitivo de uma infecção, visto que em muitos casos não é possível diferenciar uma infecção recente de uma infecção antiga.

Pesquisa de Anticorpos (m. imunológicos)

Vantagens ☺

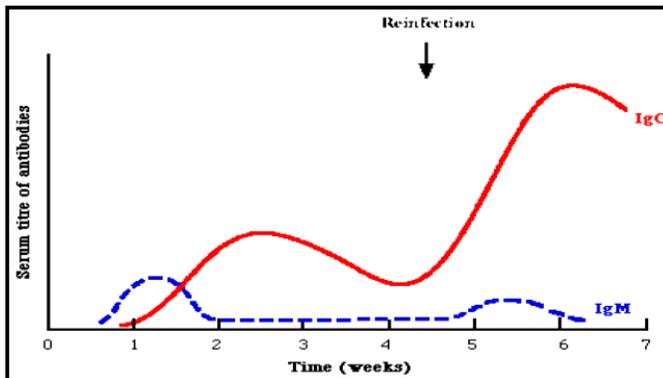
- rápido e simples de realizar.

Desvantagens ☹

- muitas vezes a pesquisa é tardia em relação à evolução da doença;
- por vezes, difícil distinguir entre infecção recente ou antiga;
- falsos positivos e negativos presentes para muitas víruses.

0 → Contacto com o vírus

O indivíduo contacta com o vírus e tem um período de incubação variável conforme o vírus, no qual há uma resposta do hospedeiro com a produção de anticorpos do tipo IgM. Estes anticorpos são os primeiros a serem produzidos após uma a duas semanas do contacto com o vírus. Logo após este contacto há produção de IgG que vai subindo e atinge o seu máximo quando a IgM já desceu para um valor quase negativo. A maioria dos doentes que chega ao médico já se encontra nesta fase, fase de queda da IgM, que muitas vezes é já negativa, e de subida de IgG.



Indicador de infecção recente: IgGs negativas e IgMs positivas. Nesta situação, é indubitável que se trata da primeira vez que o indivíduo em questão contactou com o vírus.

Complicam-se as infecções víricas quando há uma re-infecção. Imaginemos, por exemplo, uma infecção pelo vírus Influenza, que dá uma constipação vulgar.

Frequentemente, ao longo da vida, temos várias infecções pelo vírus Influenza. O que acontece com o estado imunológico do indivíduo na re-infecção? Grande parte das vezes, na re-infecção, há uma subida de quatro vezes no título de IgG, mas mais raramente a IgM sobe. Este tracejado nem sempre ocorre e, muitas vezes, não é (?? ☹), portanto, a IgM continua negativa.

Para fazer diagnóstico de re-infecção, é necessário ter um valor de comparação anterior, para saber que houve uma subida de quatro vezes no título de IgG, situação que grande parte das vezes não se tem. Quando o doente chega com sintomatologia, não temos normalmente um valor anterior do doente para

sabermos se aquele tipo de IgG subiu de facto 4x ou não, o que dificulta o diagnóstico. Ficamos sem saber se foi ou não uma re-infecção, visto que o doente mantém as IgGs toda a vida, indicando contacto com esse vírus.

Para viroses que não dão imunidade, há IgGs sempre presentes, como por exemplo o *vírus Herpes*. O *vírus Herpes* promove no hospedeiro a produção de anticorpos, que permanecem no organismo, mas o indivíduo tem a manifestação da infecção de forma recorrente. Serologicamente, o que se observa é que, mesmo numa recorrência aguda, a IgG mantém-se positiva e a IgM negativa. ("Não vos ajuda para saber se aquelas pessoas que vêm têm herpes recorrente ou se é uma infecção por varicela-zoster"). Estas são as limitações do diagnóstico laboratorial por imunoglobulinas.

Em síntese...

Critérios diagnósticos de infecção primária

- Aumentos de 4 vezes ou mais no título de IgG ou total de atc na fase aguda ou de convalescença
- Presença de IgM
- Seroconversão
- Aumento de IgG (ou total) – muito pouco provável ("se não têm registos de IgG")

Critérios diagnósticos de reinfecção (muito mais complicados)

- Aumento de 4 vezes ou mais do título de IgG or total Atc entre a fase aguda e a convalescença;
- Ausência ou ligeiro aumento de IgM.

ELISA para detecção Atc VIH

Na imagem observa-se a **técnica de ELISA** para a detecção de anticorpo para o *VIH*. A ELISA é uma boa técnica de rastreio, visto que é altamente sensível, mas pode ter falsos positivos. Assim, os que obtêm resultados negativos são negativos, mas os que obtêm resultados positivos devem ser confirmados com técnicas altamente específicas como o **Western blot**.



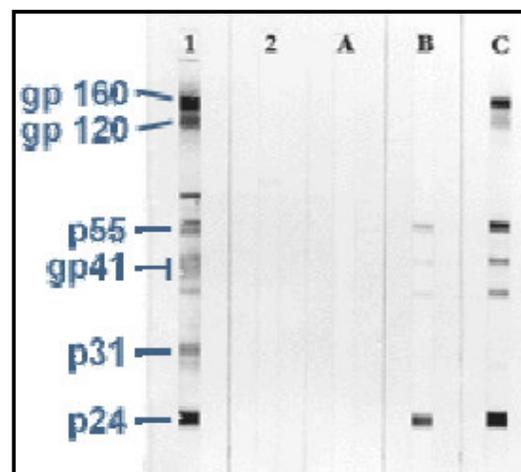
Western blot

Western Blot HIV-1

- Coluna 1: Control Positivo
- Coluna 2: Controlo Negativo
- Amostra A: Negativa
- Amostra B: Indeterminada
- Amostra C: Positiva

Estão representadas glicoproteínas do *VIH*. Pesquisa a presença desses antígenos, sempre com uma tira que é positiva e é o controlo (1), relativamente ao doente. A tira C é positiva, já que é a compatível com o controlo.

O **Western-blot** veio melhorar o diagnóstico de infecção por VIH, já que permite a pesquisa de antígenos do vírus antes do doente ter anticorpos. O doente desenvolve anticorpos duas semanas de ter contactado com o vírus. Muitas vezes, a presença desses anticorpos é muito tardia e nós podemos saber, de uma forma precoce, se o doente foi infectado pelo VIH, não procurando os anticorpos, mas procurando os seus antígenos, antes portanto do indivíduo desenvolver qualquer resposta imunológica ao vírus.



Que tipo de amostras clínicas são pedidas nas viroses?

Conforme o tipo de viroses e as queixas pode-se pedir:

- Zaragatoas ou aspirados respiratórios (naso e orofaríngeas)
- Lavados broncoalveolares ou brônquicos
- Fezes ou zaragatoa rectal
- Urina
- Lesões da pele e mucosas (cutâneo-mucosas)
- LCR, líquido pleural e líquido peritoneal
- Sangue, aspirados de medula óssea
- Tecidos biopsados

É nestas amostras que nós vamos pesquisar os vírus que achamos ou suspeitamos como sendo os mais prováveis. Conforme o tipo de virose temos estes pedidos que têm que ser ajustados a cada doente.

Combate das viroses

Para combater as viroses nós temos, neste momento, antivíricos e temos vacinas; mas não existem para todos os vírus.

Os **antivíricos** disponíveis têm a sua acção em vários caminhos da infecção da partícula vírica na célula do hospedeiro (como foi mostrado num slide), e já começam a aparecer algumas resistências à presença destes antivíricos, nomeadamente para o VIH.

Antivíricos - deu mais importância ao diagnóstico, alguns têm indicação para tratamento; alguma resistência.

As **vacinas** não estão disponíveis para todos os vírus, podendo ser vivas ou atenuadas, mas foi à custa de uma vacina que conseguimos erradicar uma virose como a Varíola (vacina viva) e, portanto, foi uma grande conquista a nível mundial a partir do aparecimento de uma vacina capaz de controlar estas infecções.

Vacinas - vivas atenuadas ou mortas, problemas com a grande diversidade e dinâmica antigénica.

Clínica

Agora vamos entrar nos vírus propriamente ditos. Queria lembrar-vos que:

- as viroses podem evoluir de uma forma assintomática ou podem ter uma clínica exuberante;
- há síndromes específicos que podem ser causados por diferentes vírus – por ex. a hepatite vírica pode ser provocada por 5 vírus diferentes;
- um tipo de vírus pode causar vários síndromes;
- vírus da mesma família afectam diferentes aparelhos ou sistemas.

VÍRUS DNA

Existem **7 grandes famílias de vírus DNA**, dos quais vamos começar a estudar as particularidades e aquilo que têm que saber. Nesta aula, vamos estudar as três primeiras famílias abaixo indicadas.

- ① *Poxviridae*
- ② *Herpesviridae*
- ③ *Parvoviridae*
- ④ *Papilomaviridae*
- ⑤ *Adenoviridae*
- ⑥ *Hepdanaviridae*
- ⑦ *Polioma viridae*

① *Poxviridae*

- Vírus DNA cadeia dupla, revestido com invólucro ou revestimento;
- Um dos maiores vírus, em termos de tamanho, dentro desta família de vírus DNA;
- Responsável por duas viroses exclusivamente humanas:

Varíola:

- ✦ Doença erradicada em 1970 no mundo;
- ✦ Vacinação começou em 1967 e já em 1977 foi registado o último caso de Varíola em todo o mundo;
- ✦ Foi utilizada uma vacina viva para induzir a produção de anticorpos que são protectores;
- ✦ Era uma doença com uma taxa de mortalidade elevadíssima e à medida que o número de casos começou a ser reduzido a vacinação começou a ser mais perigosa que a própria doença, pelo que foi suspensa a vacinação e, desde então, não foi relatado nenhum caso; no entanto, continua-se a desenvolver vacinas mais eficazes em laboratório com receio que este vírus seja usado no bioterrorismo → tem sido dos vírus mais incriminados e temidos se eventualmente for utilizado como arma de guerra.



Mollusco contagioso:

- ✦ Infecção vírica puramente cutânea e mucosa;
- ✦ É devida a um Poxvírus bastante resistente e é também uma virose exclusivamente humana;
- ✦ A **transmissão** faz-se por contacto directo → é necessário contacto pessoa-a-pessoa, pele-a-pele para ser contagiosa;
- ✦ Manifesta-se pelas lesões elevadas de centro umbilicado representadas nas imagens, e cada uma destas lesões contém numerosos vírus de características histológicas típicas;
- ✦ É encontrado frequentemente em crianças, pois é mais contagioso na criança do que no adulto. No adulto tem aparecido frequentemente na região genital e tem sido considerada, portanto, uma virose de transmissão sexual.



Tratamento disponível – consiste na remoção mecânica destas lesões ou na destruição destas pelo frio.

Diagnóstico Laboratorial - clínica e, na dúvida, histologia. A microscopia electrónica identifica o vírus, mas, nestes casos, não há necessidade de a utilizar porque estas imagens são típicas.

Cada uma das lesões observadas nas imagens contém numerosos vírus.

③ ***Parvoviridae***

- **Parvovirus B-19 – dentro desta família é o responsável por grande parte das infecções;**
- Vírus de DNA de cadeia simples, capsídeo icosaédrico, sem revestimento;
- **Transmissão-** faz-se por via respiratória, por inalação de pequenas partículas presentes na saliva com pessoas no contacto mais íntimo, familiar;
- É extremamente frequente → até aos 40 anos, 65% da população mundial já contactou com o Parvovírus B19;
- Tem uma apetência ou um tropismo especial por células eritrocitárias imaturas ainda em replicação na medula óssea. Assim, quando somos infectados por este vírus, ele dirige-se directamente para a medula óssea e vai infectar estas células da linha eritrocitária que ainda estão em mitose, provocando a lise destas. Esta lise dos glóbulos rubros, frequentemente, regista-se num indivíduo infectado pelo vírus por uma ligeira **anemia**. Existe mesmo **anemia aplásica grave que pode levar à morte** em doentes que previamente já têm anemia grave por outras razões.

Diagnóstico Laboratorial:

- ❖ Pesquisa de anticorpos:
Se IgMs positivas e IgGs negativas → estamos perante uma infecção aguda (é o nosso vírus)
Se IgMs negativas e IgGs já positivas → poderá não ser esse vírus se o apanharmos mais tardiamente;
- ❖ Técnicas de Biologia Molecular → PCR – extremamente sensível e específico, podendo ser utilizado na pesquisa do vírus mesmo nos tecidos (nos aspirados da medula óssea ou nas lesões que o vírus provoca).

Clínica:

Provoca 2 tipos de doença:

✦ **5ª doença**, muito da infância, muito frequente, também chamada de **eritema infeccioso**; o que acontece é que quando o vírus passa da árvore respiratória para o sangue provoca uma virémia, e, conseqüentemente há uma activação maciça da resposta imunológica de anticorpos, com formação de imunocomplexos. Estes imunocomplexos caracteristicamente não activam o sistema complemento, mas são causa de um eritema que começa por ser da face e depois se estende para o corpo.

O eritema da face é característico: criança com febre, e que está vermelha apenas nas hemifaces com aspecto de ter sido esboteada, daí o nome **doença do estalo**. Muitas vezes, o eritema infeccioso acompanha-se de artralgias, artrite, sendo uma resposta à presença de imunocomplexos circulantes.



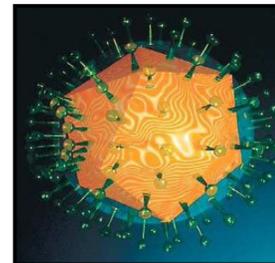
✦ **Crise aplásica** em doentes com anemia hemolítica crónica (corresponde ao efeito lateral da lise dos glóbulos rubros na medula óssea); atravessa a placenta, não sendo causa de malformações congénitas, contudo ao infectar o feto pode levar a morte fetal por anemia grave e a parto pré-termo.

Diagnóstico Laboratorial:

- ❖ Pesquisa de anticorpos;
- ❖ Pesquisa de antigénios por PCR em biopsia de tecido cutâneo ou em biopsia de medula óssea → mais fidedigno.

Herpesviridae

- Dupla cadeia DNA, cápside icosaédrica, com revestimento (representados na imagem);
- São conhecidos **8 vírus** identificados até recentemente. Estes vírus têm sido numerados de 1 a 8:



Vírus Herpes ① ②: Herpes simplex 1 e 2 (HSV 1 e 2)

Vírus com o mesmo nome, mas diferente número porque são vírus muito semelhantes que dão uma clínica exactamente igual – causam o **Herpes** – e apenas são diferenciáveis por uma glicoproteína (por uma destas estruturas que saem do revestimento), ou seja, são diferenciados por pequenas variações antigénicas na sua superfície.

Vírus Herpes ③: Varicella-zoster (VZV)

Vírus Herpes ④: Epstein-Barr (EBV)

Vírus Herpes ⑤: Citomegalovirus ou Vírus Citomegálico (CMV)

Vírus Herpes ⑥ ⑦ ⑧: Herpes Virus 6, 7 e 8 (HH6, HH7 e HH8)

Não têm outro nome como os outros, uma vez que dão uma série de doenças, não são tão específicos nas doenças que provocam como os anteriores e, portanto, foram os últimos a serem identificados, tendo sido o 8 o mais recentemente identificado desta grande família.

Todos os vírus desta família têm em comum o facto de estabelecerem uma infecção crónica no hospedeiro, mantendo-se longos períodos e anos latentes dentro da célula sem a destruir, vivos, metabolicamente activos e só quando se replicam, quando o seu genoma começa a replicar, é que levam à lise das células (efeito citopático); mas mantêm-se sempre no organismo. Quase 100% da população mundial já contactou com um destes vírus Herpes, o que significa que são vírus extremamente comuns. O indivíduo desenvolve anticorpos contra estes vírus que têm a sua utilidade, mas não evitam a recorrência das infecções.

Herpes simplex 1 e 2

A sua transmissão é feita por contacto directo com as lesões (imagem: lesão de herpes labial).

Têm um caminho muito comum: o vírus entra na **pele** ou nas **mucosas**, no epitélio de revestimento, atravessa a espessura da pele e tem tropismo para os **nervos aferentes**, portanto estruturas nervosas que vão ter à pele. Daí, vão ter aos **gânglios sensitivos regionais** e é nos gânglios sensitivos regionais que estabelece uma latência, permanecendo lá. Volta a replicar em qualquer altura, caminha ao longo do nervo eferente e volta à pele. Assim se justifica que as infecções herpéticas frequentes sejam geralmente no mesmo local. Porquê? Porque é o local que é enervado pelo gânglio sensitivo que tem o vírus. Uma pessoa pode ter um herpes oral e pode ter um herpes na coxa. A entrada foi diferente e o gânglio infectado foi diferente. Esta é a fisiopatologia da doença.



Clínica:

Grande parte da população quando contacta com o vírus, não se apercebe, a primoinfecção é assintomática. Uma minoria tem infecção evidente, que varia.

A **gingivoestomatite (HSV 1)** nas crianças é geralmente devido a um herpes. O primeiro contacto com o vírus leva a uma reacção imunológica exuberante, com febre, adenopatias regionais, aftas orais extremamente dolorosas que duram cerca de 1 a 2 semanas e desaparecem espontaneamente.

A **faringite** também pode ser herpética.

O **herpes labial** é mais comum, e geralmente devido ao **herpes tipo 1**.

A **infecção genital**, em geral, é devido ao **herpes tipo 2**.

A **conjuntivite**, a **queratite**, a **encefalite herpética** pode ocorrer na primoinfecção nos doentes imunodeprimidos, o vírus pode induzir uma viremia e nessa situação alojar-se no SNC e dar doença disseminada. Isto ocorre sobretudo no herpes neonatal.

O **herpes neonatal** é uma situação grave de prognóstico reservado, em que a criança é infectada pelo herpes durante o parto, quando contacta com secreções genitais da mãe (que tem herpes) e nessa altura adquire o herpes, que promove uma doença grave.

Diagnóstico Laboratorial:

A serologia pode ser uma ajuda, mas grande parte das vezes não é. Grande parte das vezes o doente já contactou com o herpes e tem anticorpos IgG positivos.

A **pesquisa de antigénio** é o que é mais utilizado, usando técnicas de PCR e LCR, que podem ser procuradas nas lesões. Estas lesões são picadas, faz-se uma colheita da base da vesícula para a pesquisa de herpes por técnicas de PCR ou de imunofluorescência, que é altamente sensível. Pode ser também feita esta técnica em tecidos e na suspeita de meningoencefalite, no líquido cefaloraquidiano, sendo neste líquido obrigatório a utilização de técnicas de biologia molecular como PCR ou LCR.

Para o controlo do herpes não há controlo epidemiológico. O que temos em mãos são antivíricos. Estes **antivíricos anti-herpéticos** só actuam enquanto o vírus está a replicar, não actuam nos vírus latentes e por isso é um **tratamento não curativo**.

Estão em desenvolvimento **vacinas**, que devem estar comercializadas nos próximos 2 anos contra o herpes tipo 2, que é um herpes que neste momento do ponto de vista epidemiológico mais preocupa. Esta vacina parece ser mais eficaz em mulheres do que em homens e prevê-se a sua comercialização em 2008 ou 2009.

Varicella-zoster

O vírus Varicella-zoster tem um caminho muito semelhante ao herpes simples.

A transmissão ocorre por contacto íntimo e por respiração, inalação. Uma criança com varicela (que é a primoinfecção deste vírus) transmite a varicela à outra por contacto chegado e respirando para ela. A inalação das pequenas partículas respiratórias faz com que a outra pessoa fique com varicela.

Entra por **via respiratória**, provoca uma viremia e o vírus vai-se alojar nos **gânglios sensitivos dorsais**. Todos os gânglios sensitivos dorsais que acompanham a coluna. O vírus sai do sangue, entra lá e fica lá alojado.

A primeira vez que o indivíduo contacta com este vírus tem varicela, se for clinicamente evidente. É uma doença da infância.

O doente tem varicela mas fica com o vírus lá. A varicela cura, desaparece, mas o vírus fica sempre nos gânglios paradorsais. Em qualquer altura o vírus replica e vai provocar a zona ou herpes zoster.

O vírus varicella-zoster é um nome que representa a varicela como sendo a primoinfecção e a zona como sendo a reactivação.

No herpes, temos o mesmo nome para a primoinfecção e para as recorrências, aqui temos dois nomes diferentes. Porquê? Porque quando este vírus reactiva, só reactiva um dos gânglios, um ou dois, e provoca uma zona. Zona quer dizer lesões numa área, e essas lesões são tipicamente na área do dermatomo, sendo o dermatomo a área cutânea ou mucosa que é enervada por um determinado gânglio sensitivo.

Diagnóstico Laboratorial:

Para se fazer o diagnóstico definitivo temos a **cultura celular**, o **shell vial**, a **imunofluorescência directa** contra o vírus e ainda o **PCR**.

Em todas estas situações se usa como amostra clínica as lesões cutâneas – são vesículas em tudo muito semelhantes ao que acontece no herpes

Clínica:

Na imagem está representada uma zona.

Na varicela temos grandes vesículas que aparecem hora a hora, caracteristicamente da cabeça para os pés, isto é: são muito frequentes na área central e depois na área lateral são lesões muito mais dispersas.



Para o vírus varicella-zoster temos um **antivírico**, que também apenas actua na replicação do vírus.

Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr é o 4.º vírus da família herpes. É um vírus que se adquire por contacto com a saliva. É considerada a doença da adolescência, ou a doença do beijo. As células-alvo do vírus são os **linfócitos B**. Em relação ao herpes 1 e 2 as células-alvo são as células cutâneas, os queratinócitos, e os nervos, têm grande tropismo para essas áreas. Aqui são os linfócitos B.

As doenças que o EBV provoca estão aqui resumidas:

- ✦ **mononucleose infecciosa** (caracterizada por febre, mialgias, astenia, linfadenopatia; extremamente frequente);
- ✦ doença linforreticular progressiva;
- ✦ leucoplasia de células em cabeleira;
- ✦ linfoma de Burkitt;
- ✦ carcinoma nasofaríngeo.

A mais frequente é de facto a primeira, tem um prognóstico bom, contrariamente a todas as outras, que são mais complicadas.

À semelhança dos outros vírus herpes, este vírus, depois de contactado, fica presente no organismo e pode ser reactivado em determinadas situações. Isso tem sido verificado em doentes imunocomprometidos.

Diagnóstico Laboratorial:

O diagnóstico baseia-se na presença de uma **linfocitose**. Há presença de linfócitos B atípicos, linfócitos que respondem à presença do vírus (os linfócitos B são o órgão-alvo) e de linfócitos T típicos, que são uma resposta para matar os linfócitos B infectados pelo vírus.

É possível ainda a utilização da **serologia**, através da pesquisa de anticorpos heterófilos, anticorpos específicos contra o vírus Epstein-Barr. Este método tem alguns falsos negativos. Usa-se cada vez mais a pesquisa de anticorpos específicos para o vírus Epstein-Barr que já estão disponíveis e são esses em que se baseia o nosso diagnóstico.

Podemos ainda usar técnicas de **PCR** para o diagnóstico.

Citomegalovirus

Como o nome indica, é um vírus que aumenta a célula. Este vírus é o paradigma do efeito citopático, aquele vírus que entra na célula, torna-a vacuolizada, grande, arredondada. Muitas vezes nas lesões que o CMV dá nós podemos ver esses efeitos citopáticos nas células.

A transmissão ocorre por contacto com secreções infectadas, através de sangue e em órgãos transplantados.

É também um vírus extremamente frequente e é causador de doença especificamente em doentes imunodeprimidos.

A latência ocorre em leucócitos, células endoteliais e células de vários órgãos.

É uma doença assintomática, importante como infecção congénita, é causa de partos pré-termo e de malformações e é sempre sintomática em imunodeprimidos.

Diagnóstico Laboratorial:

O diagnóstico pode fazer-se por cultura, **shell vial**, **pesquisa de antígeno por imunofluorescência ou ELISA**, ou então por **PCR**, no sangue, nas secreções infectadas, ou mesmo esse estudo é feito nos órgãos antes de serem transplantados.

Herpes vírus 6, 7 e 8

São vírus extremamente **prevalentes**, cuja transmissão ocorre por contacto directo ou respiratório. Têm afinidades diferentes: a latência ocorre em **linfócitos T**, para o **vírus 6 e 7**, e em **linfócitos B**, para o **vírus 8**.

Os **vírus herpes 6 e 7** dão **infecções da infância** - são responsáveis pelo **exantema súbito**.

O **vírus herpes 8** é responsável pelo **sarcoma de Kaposi** (neoplasia muito frequente em doentes com SIDA), **linfoma de células B** e **doença de Castleman**.

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico faz-se procurando estes **anticorpos IgG e IgM** e a pesquisa directa destes vírus por **PCR** no sangue ou nas lesões.



Bom Estudo, pessoal! ☺

*Cátia Cunha
Cláudia Patraquim
Inês Valdoeiros
T12*

