



GENERALIDADES DE VIROLOGIA

Bioq. Cristina Lema

¿Qué es un virus?



Virus

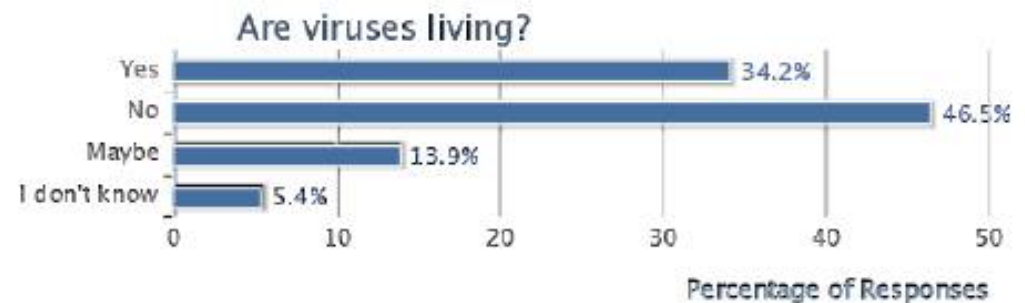
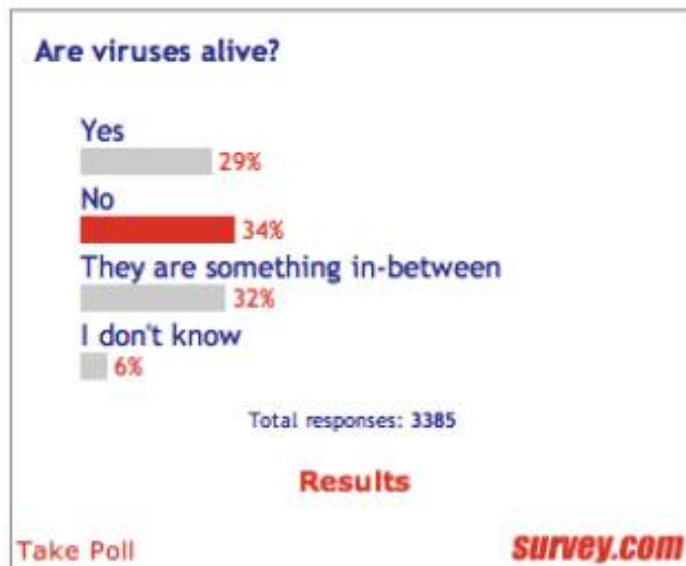
- Son **parásitos intracelulares obligatorios**, no pueden sintetizar ATP ni proteínas independientemente de la célula.
- Los virus no son seres celulares.
- El genoma viral puede ser ARN o ADN, pero no ambos.
- Los virus poseen una cápside protéica y algunos una envoltura.
- Los componentes virales se ensamblan y no se replican por "división".



¿Son seres vivos?




Are viruses alive?



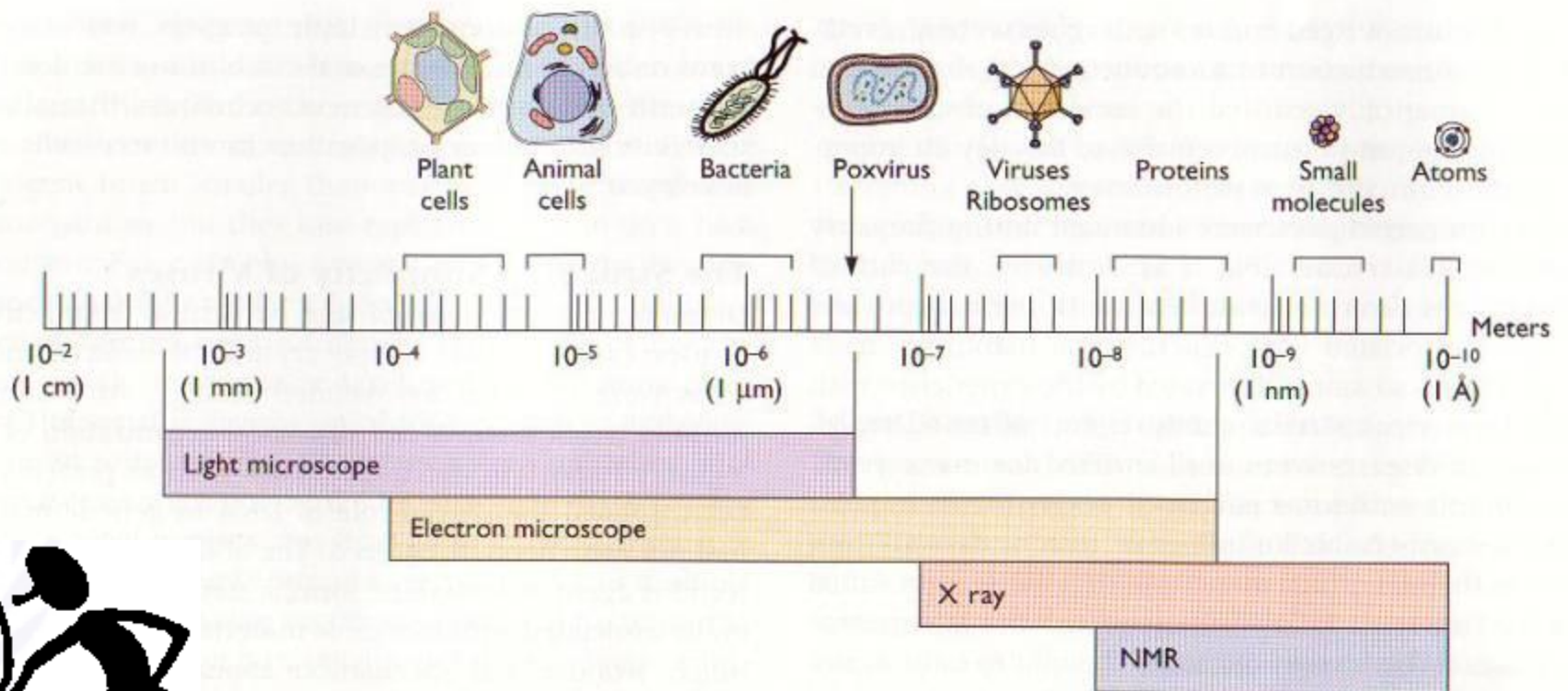


¿Porqué es importante el estudio de los virus?



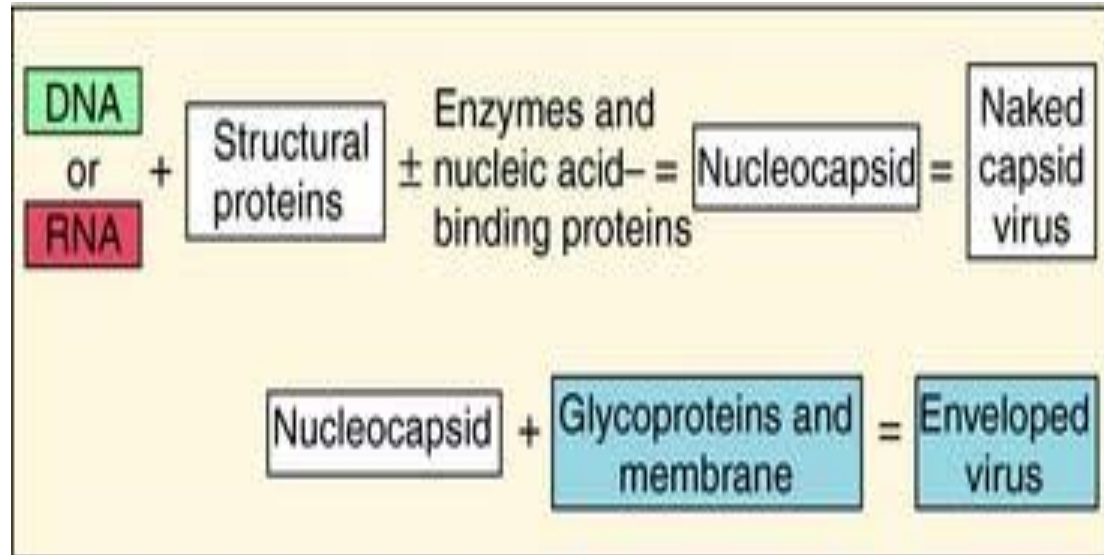
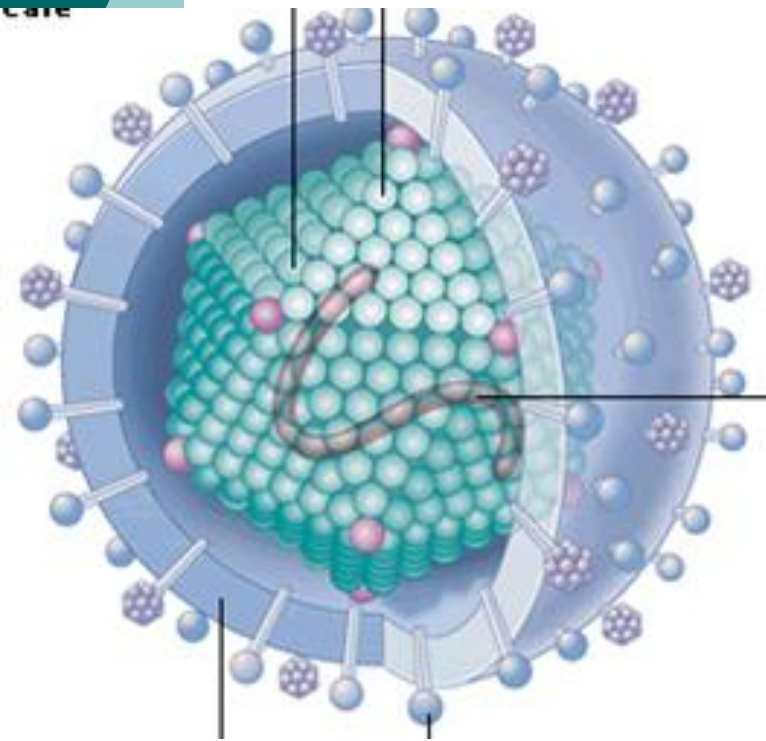
- 
-
- Importancia biológica. Todos los seres vivos del planeta tienen virus que los parasitan.
 - Importancia clínica. Son los causantes de numerosas enfermedades.
 - Son importantes herramientas en investigación. Utilizando virus se ha avanzado en la Biología Molecular, conocimiento de genes, de mecanismos de replicación, transcripción, ác. nucleicos, etc.

Tamaño



1 m = 0,000000001 nm
Aprox: 20 a 250 nm

Componentes del virión



Genoma viral

- DNA:
 - **doble cadena** - lineal (Herpesvirus, Adenovirus)
 - circular (Papilomavirus, Poliomavirus)
 - simple cadena - lineal (Parvovirus)
 - circular (v. bacterianos)
- RNA: **mayoría simple cadena** y lineal
 - genoma fragmentado o segmentado
Ej. Virus de la gripe (sc) Orthomixoviridae.
 - **doble cadena** (Reovirus)

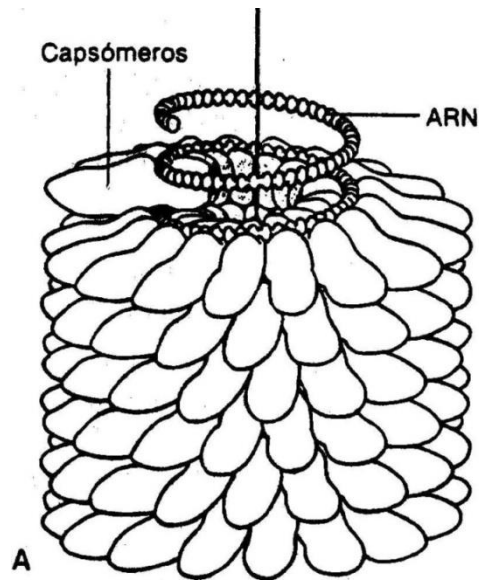
Polaridad del ARN

- **ARN Polaridad (+):** codifica como ARNm, se traduce a proteína.
- **ARN Polaridad (-):** debe pasar a ARN (+) para poder traducirse a proteína
- **Polaridad mixta** o bisentido: arenavirus

Cápside

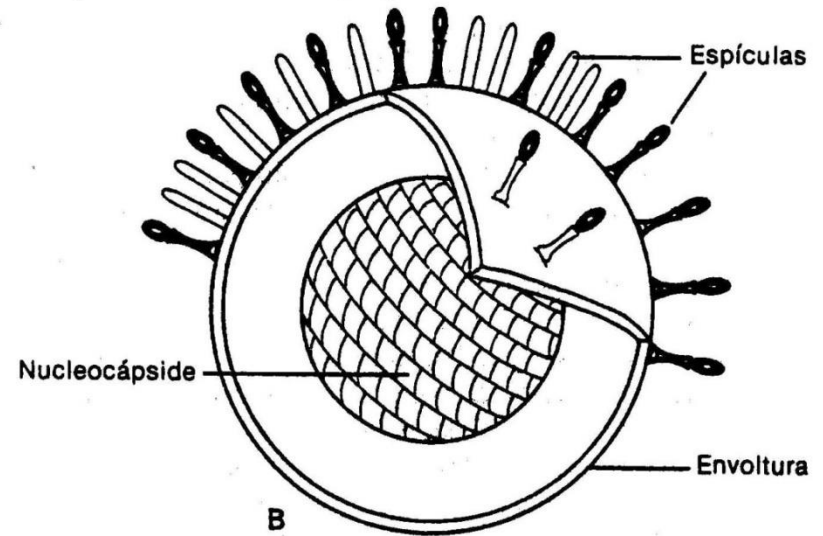
- Es una estructura que rodea y protege al genoma vírico y está formado por proteínas codificadas por genes del virus.
- Estas proteínas que forman la cápside se denominan protómeros.
- **Simetría** es la forma que adopta un virus en el espacio, esta dada por la estructura de la Nucleocápside.

Simetría Helicoidal



Desnudo

Ej: mosaico del tabaco

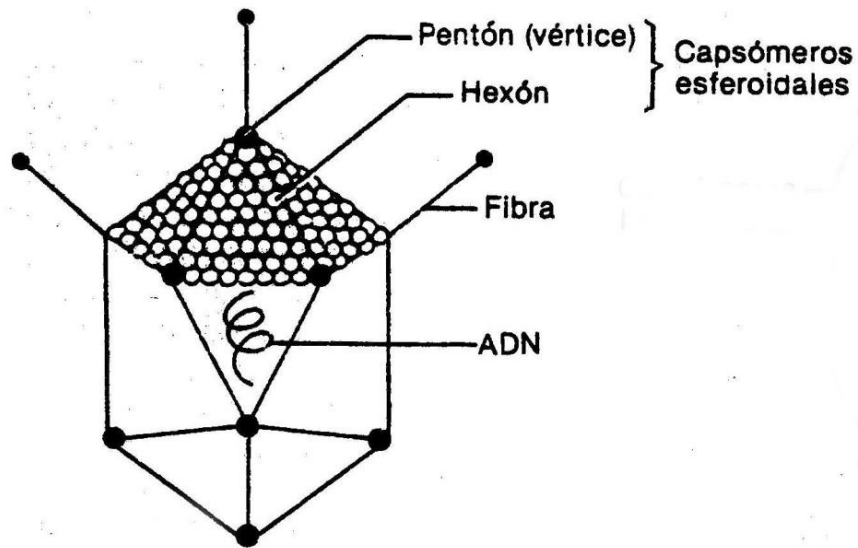


Envuelto

Ej: Ortomixovirus

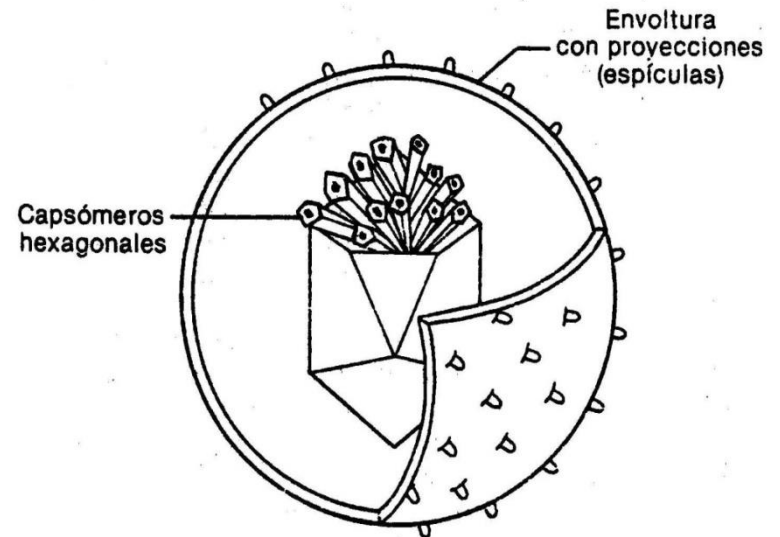
Nucleocápside cilíndrica que puede estar extendida o enrollada sobre si misma.

Simetría Icosaédrica



Desnudo

Ej: Adenovirus

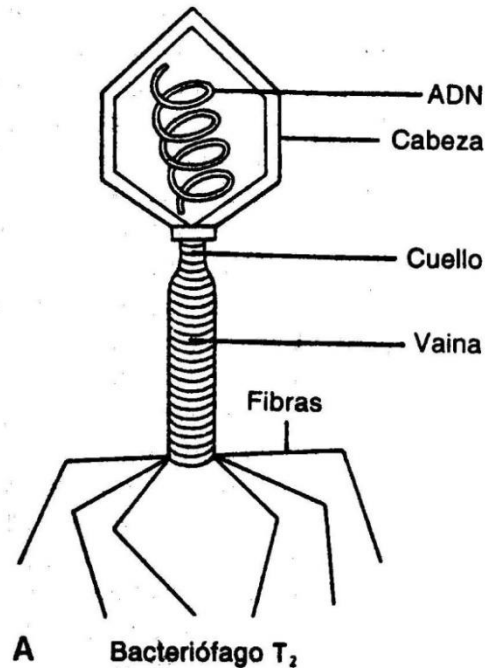


Envuelto

Ej: Herpesvirus

Son icosaedros regulares, de 20 caras triangulares, 12 aristas.

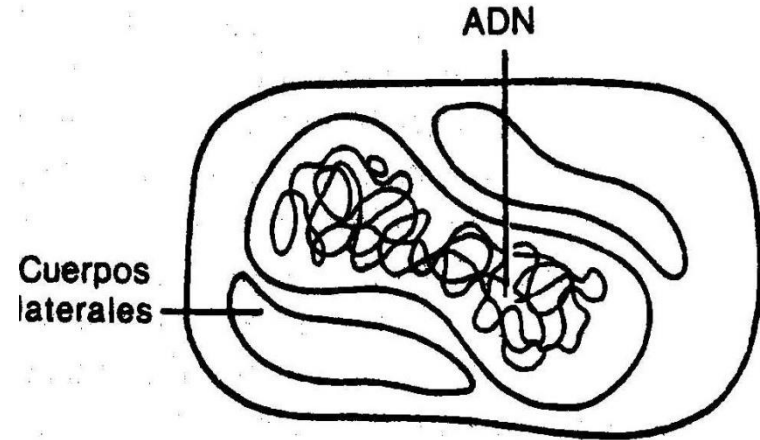
Binaria y Compleja



A Bacteriófago T₂

Binaria

Cabeza icosaédrica y cola helicoidal.



B

Poxvirus
Formas de ladrillo

Complejo

Nucleocápside helicoidal o icosaédrica recubierta por una envoltura laxa. Ovoides, esféricos o pleomorficos

Envoltura

- Es una capa membranosa que rodea la nucleocápside de diferentes virus. Esta envoltura tiene estructura de membrana, con bicapa lipídica con proteínas:
- Los **lípidos** de la envoltura proceden de las membranas de la célula hospedadora.
- Las **proteínas** están codificadas por genes del virus
 - **Glicoproteínas**: tiene unidos azúcares. Sobresalen de la membrana. Espículas o peplómeros.

Fn: Unión a célula hospedadora
Actividad enzimática

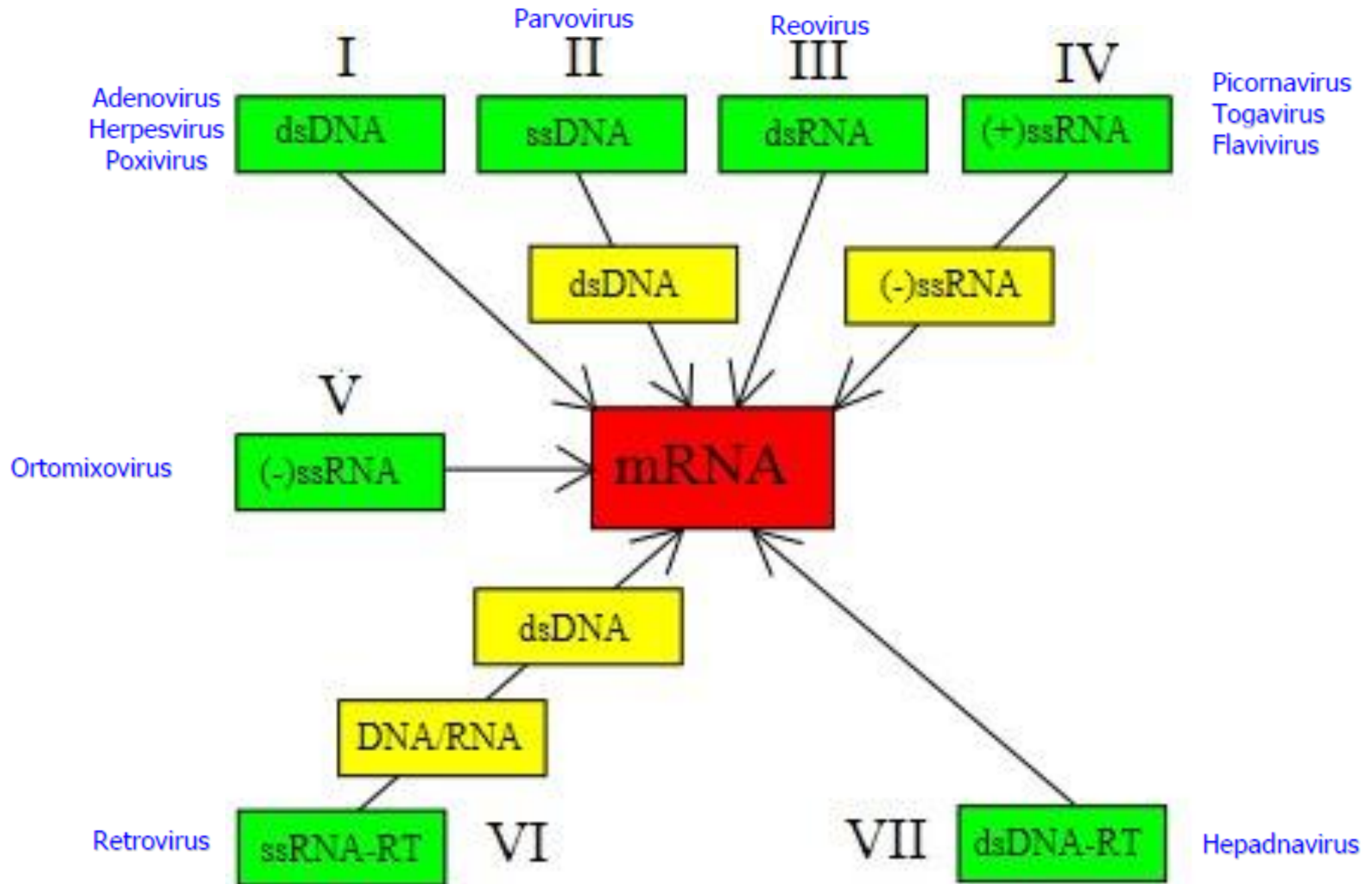
Proteínas

- **Constituyen del 50 al 90% de la partícula viral**
- **Estructurales:** están presentes en el virión en una proporción importante y mantienen la estructura del mismo.
 - *Superficie:* constituyen los capsómeros y peplómeros (proyecciones de la envoltura, glicoproteínas, ej: Hemaglutinina y Neuraminidasa)
 - *Internas:* ubicadas en la cara interna de la envoltura, entre capas de capsómeros, en el centro del virión.
- **No Estructurales:** enzimas requeridas para el ciclo de replicación, que se sintetizan en la fase temprana de la replicación.

Clasificación viral: Criterios

1. Genoma: tipo de ácido nucleico y características del mismo
2. Tamaño del virión
3. Cápside (simetría)
4. Envoltura: presencia o ausencia
5. Genómica: secuencia nucleotídica

Clasificación Baltimore



Clasificación ICTV

- El **Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV)**:
- La estructura general de la taxonomía es la siguiente (2012)

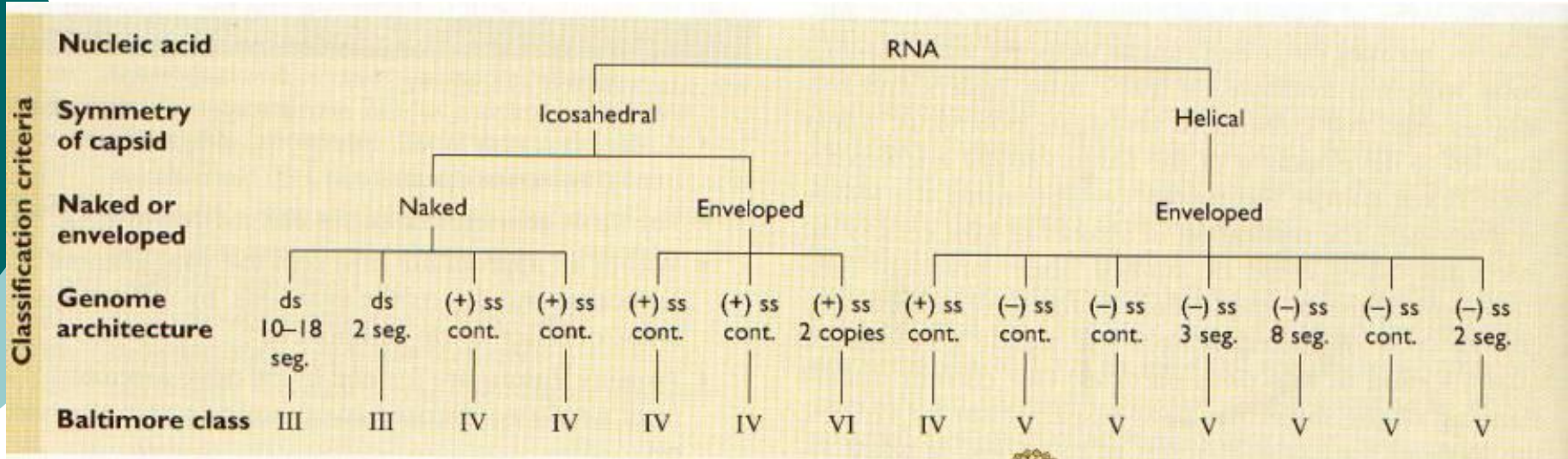
Taxón	Terminación	N
Orden	-virales	7
Familia	-viridae	96
Subfamilia	-virinae	22
Género	-virus	420
Especie	virus	2618

• Los órdenes son: caudovirales, herpesvirales, ligamenvirales, mononegavirales, nidovirales, picornavirales y tymovirales.

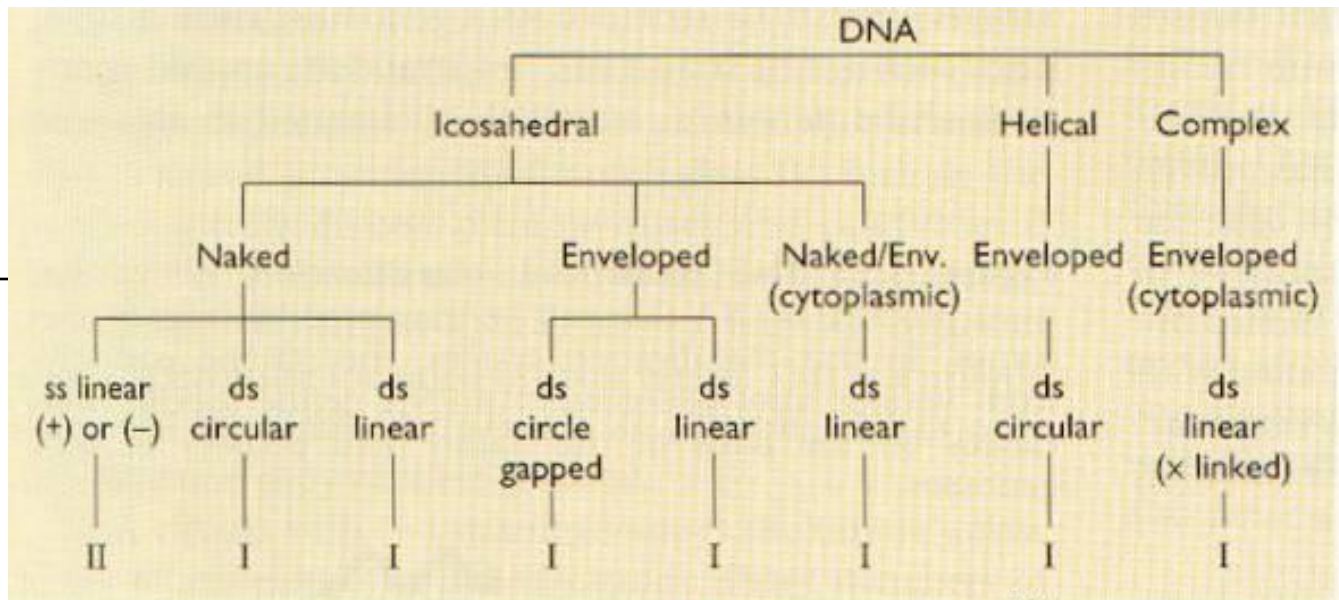
• El comité no distingue formalmente entre subespecies, cepas y aislamientos.

Clasificación ICTV

- El ICTV estableció la base de datos de virus universal de la ICTV (ICTVdB), disponible en internet.
- <http://www.phene.cpmc.columbia.edu/index.htm>
- <http://www.ictvonline.org/index>.



Properties	Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Orthomyxo	Paramyxo	Arena
Family name	Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Orthomyxo	Paramyxo	Arena
Virion polymerase	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Virion diameter (nm)	60-80	60	35-40	28-30	40-50	60-70	80-130	80-160	80 x 790-14,000	70- 85 x 130-380	90-120	90-120	150-300	50-300
Genome size (total in kb)	22-27	7	8	7.2-8.4	10	12	3.5-9	16-21	12.7	13-16	13.5-21	13.6	16-20	10-14



Parvo	Papova	Adeno	Hepadna	Herpes	Irido	Baculo	Pox
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
18-26	45-55	70-90	42	150-200	125-300	60 X 300	170-200 X 300-450
5	5-8	36-38	3.2	120-200	150-350	100	130-280

Etapas de la replicación viral I

Iniciación:

- a) **Adsorción:** es la unión *específica* de la proteína viral de superficie con el receptor de la membrana celular.
- b) **Penetración:** Endocitosis mediada por receptor (EMR), o fusión
- c) **Desnudamiento:** del genoma viral. Citoplasma o en los poros de la membrana nuclear.

2. Expresión y replicación del genoma:

Genomas virales poseen diferentes estrategias de multiplicación viral.

ARNm viral. Síntesis de **proteínas** virales.

- a) Proteínas que interfieren con el metabolismo celular
- b) **Polimerasas:** síntesis de ácidos nucleicos virales
- c) **Estructurales:** formaran la estructura de los viriones

Etapas de la replicación viral II

3. **Ensamble, maduración y egreso de la célula infectada**

a) Intracelular:

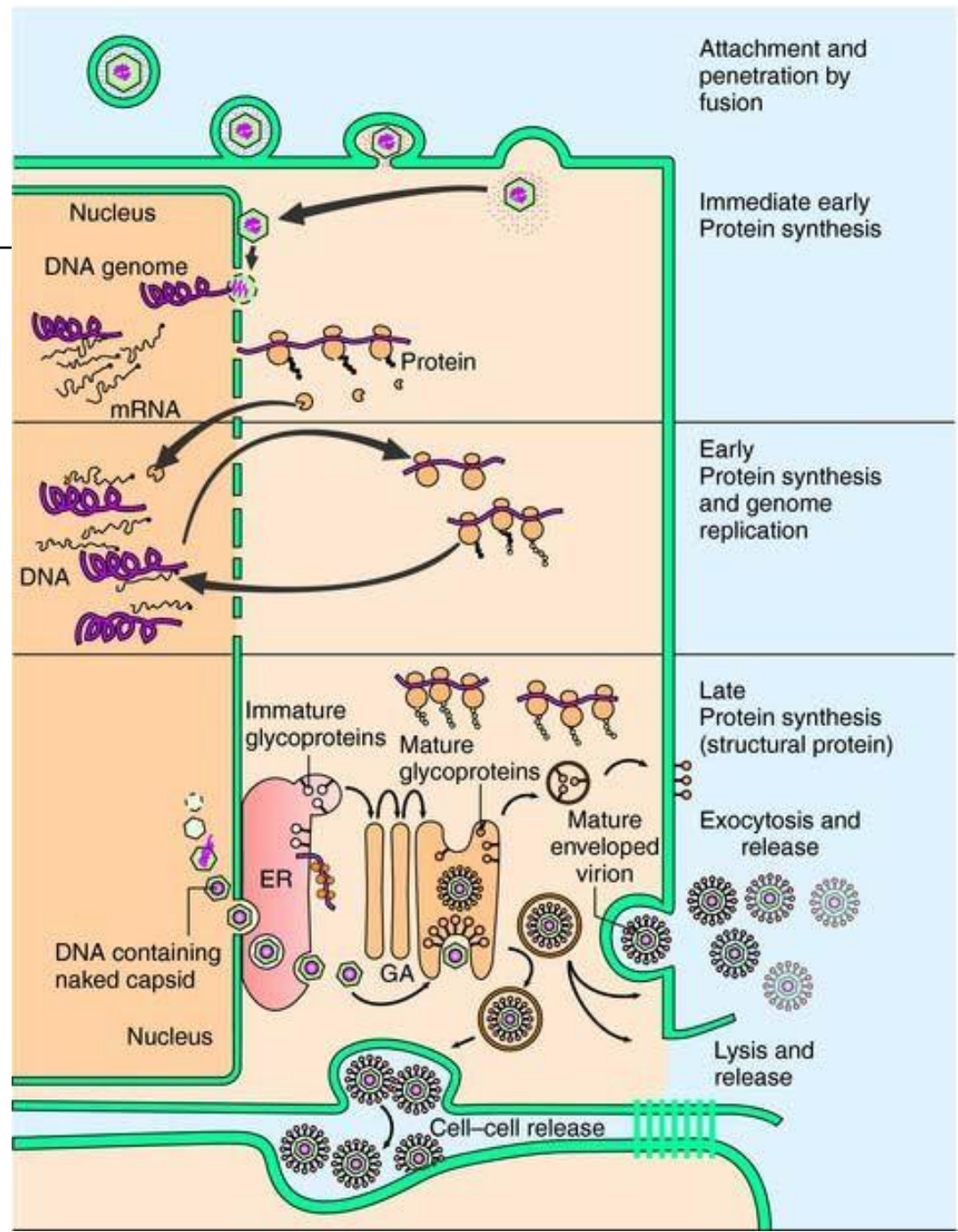
- en el citoplasma celular
- núcleo celular

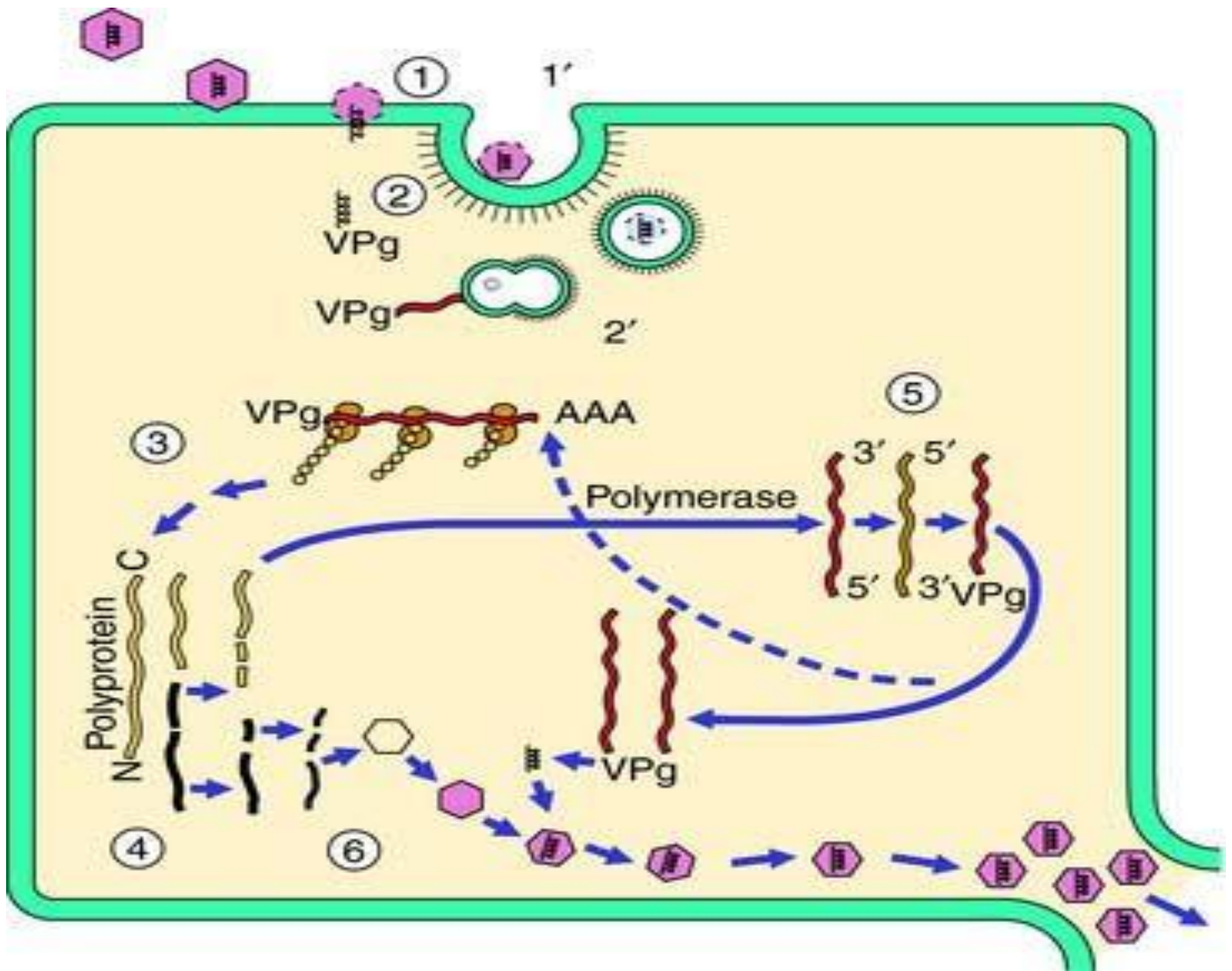
b) Ensamble es simultáneo al egreso de la célula.

- Membrana citoplasmática
- virus emergen por brotación.
- lisis celular

c) Ensamble en el núcleo celular: herpesvirus.

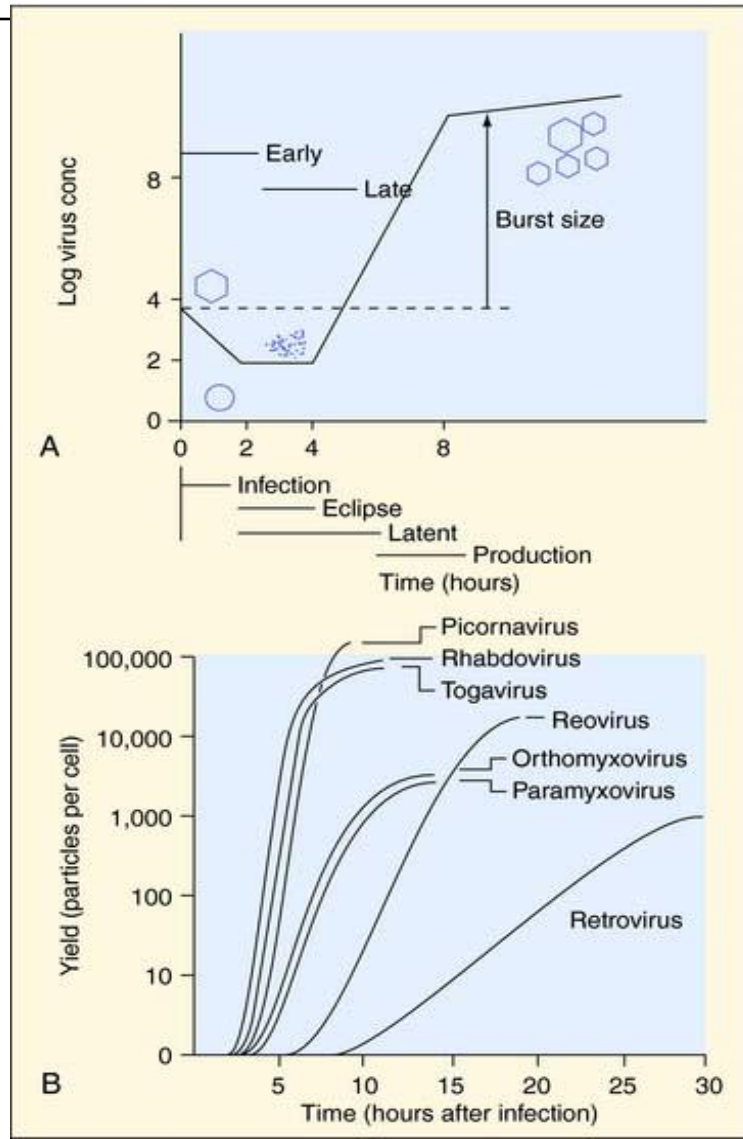
Herpesvirus DNA, envuelto





Picornavirus: RNA (+) desnudo

Curva de crecimiento de un único ciclo de multiplicación viral



Patogenia viral

Virus

- Inoculo inicial
- Puerta de entrada
- Estructura genética y antigénica del virus
- Modulación de la respuesta del huésped

○ Huésped

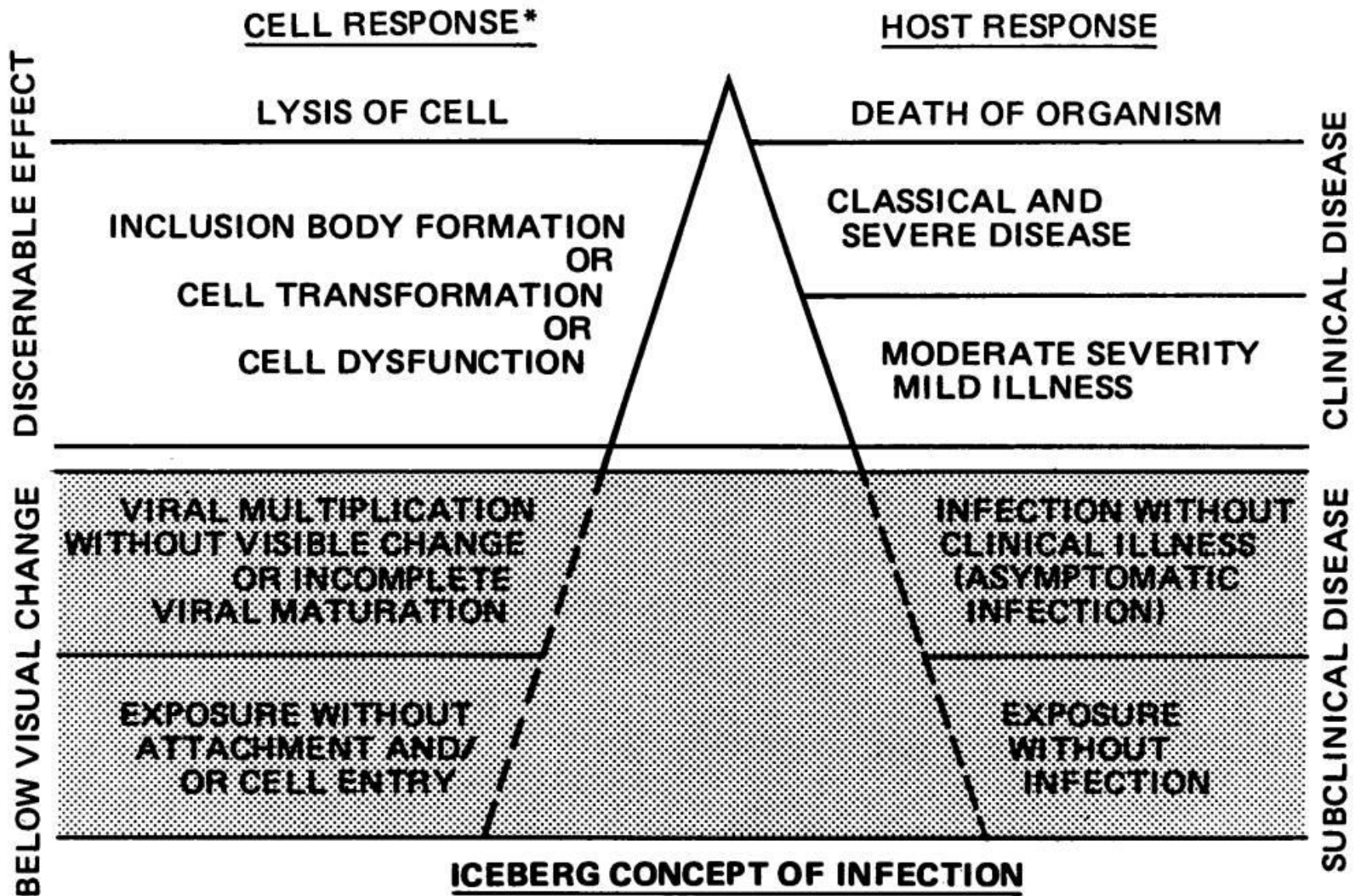
- Carga genética (Factores de resistencia)
- Edad
- Sexo
- Embarazo
- Estado de salud

Virulencia vs atenuación

Tropismo

Célula **SUCEPTIBLE** y **PERMISIVA**

- **La relación virus huésped es específica:** dada por la unión de proteínas virales a receptores de la membrana celular.
- Virus afecta a una especie: humanos, ej, Sarampión
- Virus que producen zoonosis: Rabia
- Virus que afectan un tejido: hepatotropos, neurotropos
- Virus que afectan muchos tejidos pantotropos, ej: sarampión.



Patogenia de las infecciones virales

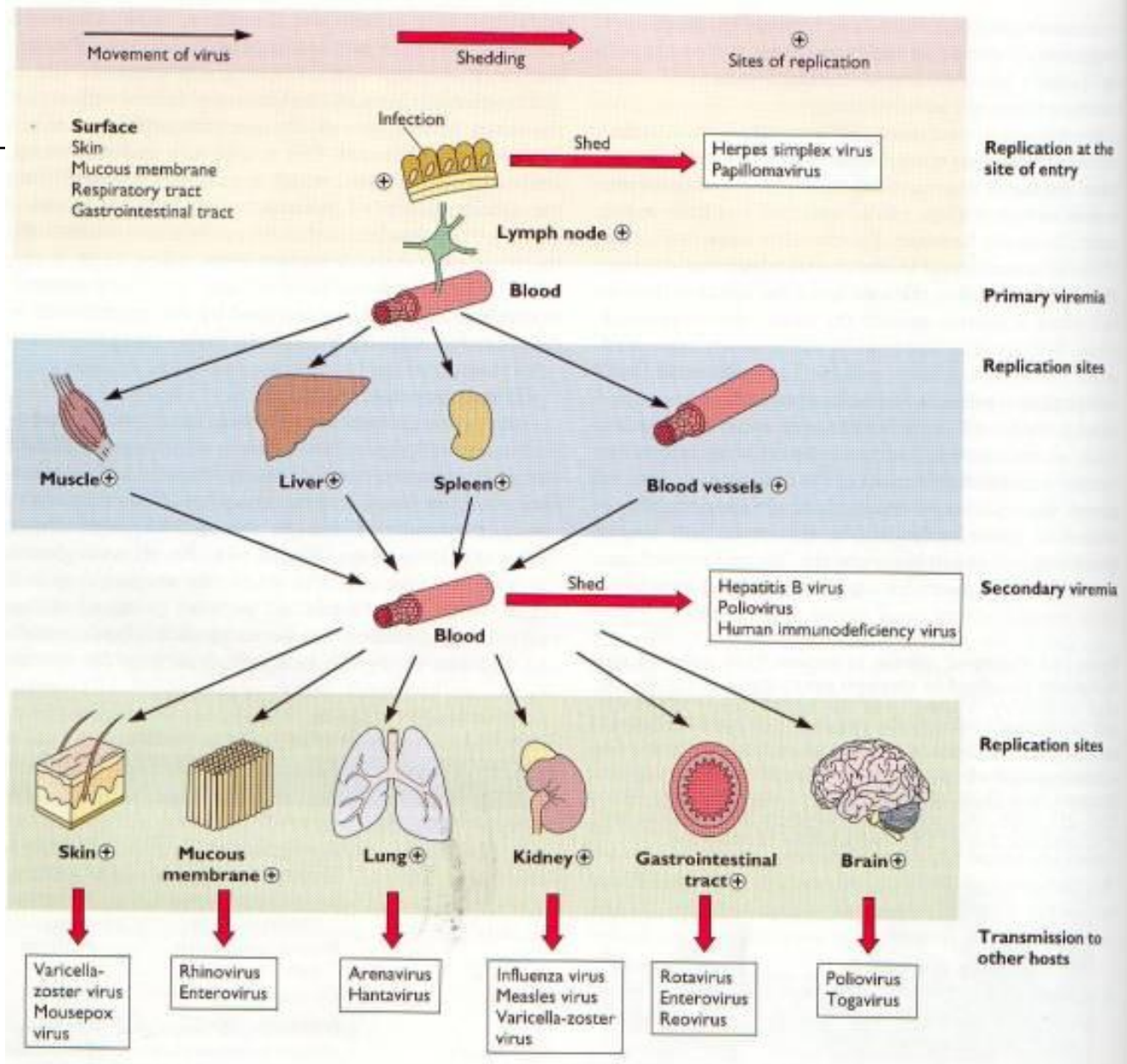
Estadíos:

1. **Infección inicial** del huésped: el virus se adsorbe a células susceptibles y luego penetra en el tejido. Puertas de entrada.
2. **Diseminación** de la infección: multiplicación y diseminación local a través del cuerpo.
3. **Eliminación** de virus al exterior. Relacionado con la transmisión viral.

Puertas de entrada

Organo	Virus	Mecanismo
Piel	Rabia	Mordedura por perros y zorros
	Arbo=Fiebre amarilla	Picadura de artrópodos (Aedes aegypti)
	HBV, HVC, HIV, EBV, CMV	Transfusiones, inyecciones
	Papiloma	Verruga en piel
Tracto respiratorio	Influenza, Parainfluenza, Sarampión	Vía aérea, intensidad de las secreciones por boca o nariz, contaminación manos, etc
Orofaringe y tracto entérico	EV, Rotavirus, ADV 40 y 41	Contaminación fecal-oral
Tracto genito-urinario	ADV 11y21, BK, HSV-1y2, HIV, HBV, Papiloma	Relaciones sexuales, canal de parto
Vía conjuntival	ADV 8, EV 70	Contacto con objetos contaminados

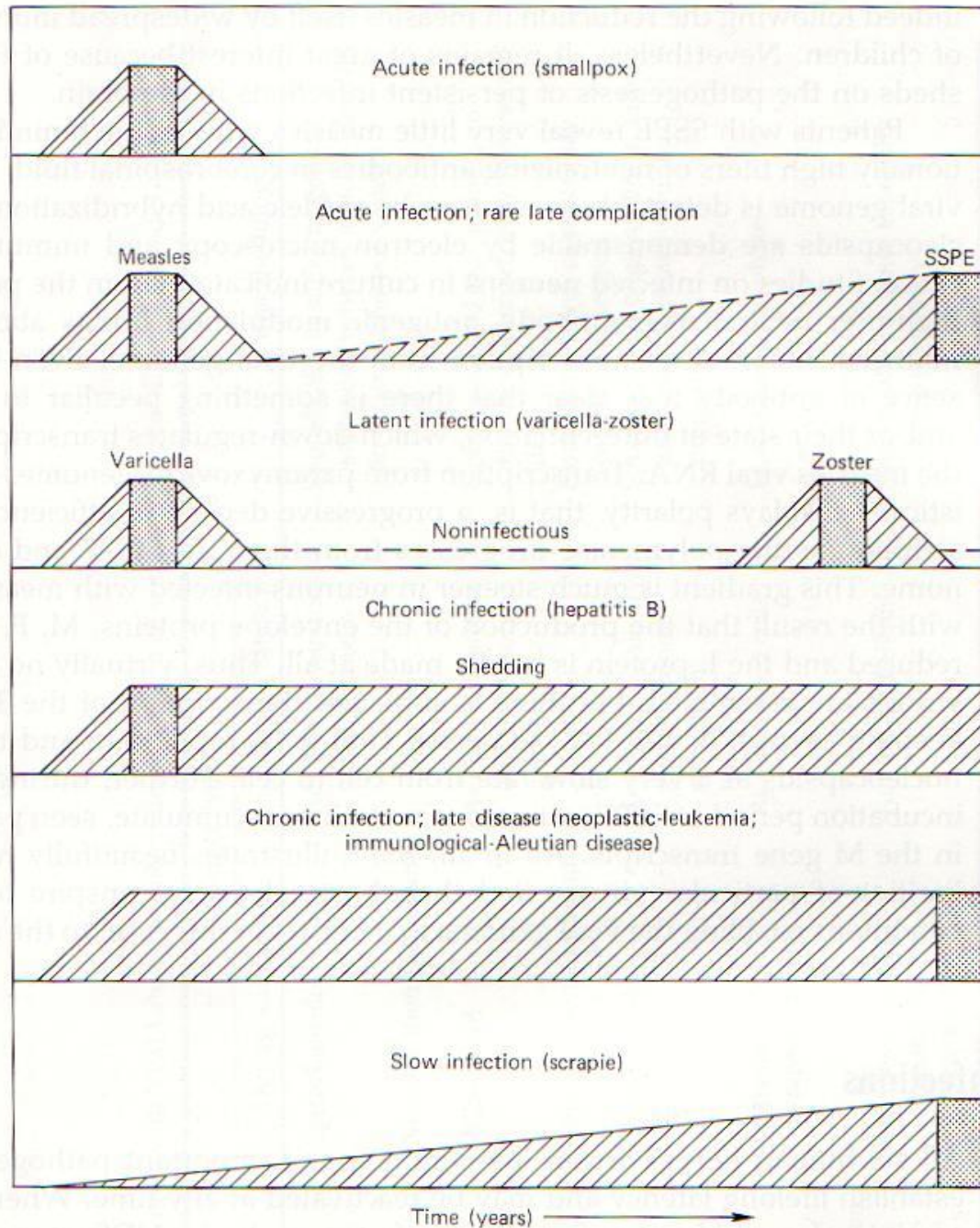
Vías de diseminación



Transmisión de virus al exterior del organismo

- Liberación viral de la célula, salida del huésped, transporte a través del medio ambiente en forma viable y entrada apropiada a un nuevo huésped susceptible.
- Factores que intervienen:
 1. Cantidad de virus.
 2. Estabilidad viral en el medio ambiente
 3. Presencia de vectores transmisores
 4. Disponibilidad de huéspedes susceptibles
 5. Constitución genética del virus y el huésped
- Fuentes de transmisión: **secreciones respiratorias, saliva, heces, orina, secreciones genitales, leche, sangre o piel.**

Tipos de infecciones virales



Efecto de agentes fisicoquímicos sobre los virus I

- Determinar la viabilidad de muestras clínicas para el diagnóstico virológico.
- La conservación de vacunas virales a virus vivo.
- Estimar la infectividad a temperatura ambiente.
- Decontaminar materiales.
- Efectuar un tratamiento adecuado para el agua potable.

Efecto de agentes fisicoquímicos sobre los virus II


- **Temperatura:** los virus son lábiles al calor. En general se inactivan 1 hs a 60°C.
- **pH y medio iónico:** mejor conservación en medios isotónicos y pH fisiológico. Excepción: enterovirus estables a pH 3.
- **Radiaciones:** UV y ionizantes (rayos X y gamma) inactivan a los virus por su acción sobre el genoma viral.
- **Solventes lípidos:** los virus envueltos son sensibles a éter, cloroformo, sales biliares, detergentes aniónicos. Los virus desnudos son resistentes a los solventes lipídicos. Ej. Enterovirus.



DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

¿Para qué sirve?



- 
-
- Diagnóstico individual en un caso clínico.
 - Intervención terapéutica: tratamiento específico.
 - Para definir un pronóstico en la evolución del paciente
 - Indicar la necesidad de una vacunación.
 - Vigilancia epidemiológica: incidencia de enfermedades, cepas circulantes de virus.
 - Para adoptar medidas de salud pública en la comunidad.

Calidad de la Muestra

- ✓ **La calidad del diagnóstico virológico está condicionado por la calidad de la muestra.**
- **Tipo de muestra:** depende de la patología y el virus
- **Tiempo** de toma de muestra: dentro de los **7 días** de iniciado el cuadro clínico, para serología también a los **14 o 21 días**.
- **Calidad:**
 - Viabilidad viral
 - Integridad genoma viral
 - Presencia de inhibidores
 - Biopsias del lugar del foco
- **Cantidad: 0,5 ul**
 - PCR 100-200 ul
 - Cultivo 200 ul
- **Tiempo y condiciones de transporte**

Tipos de muestras

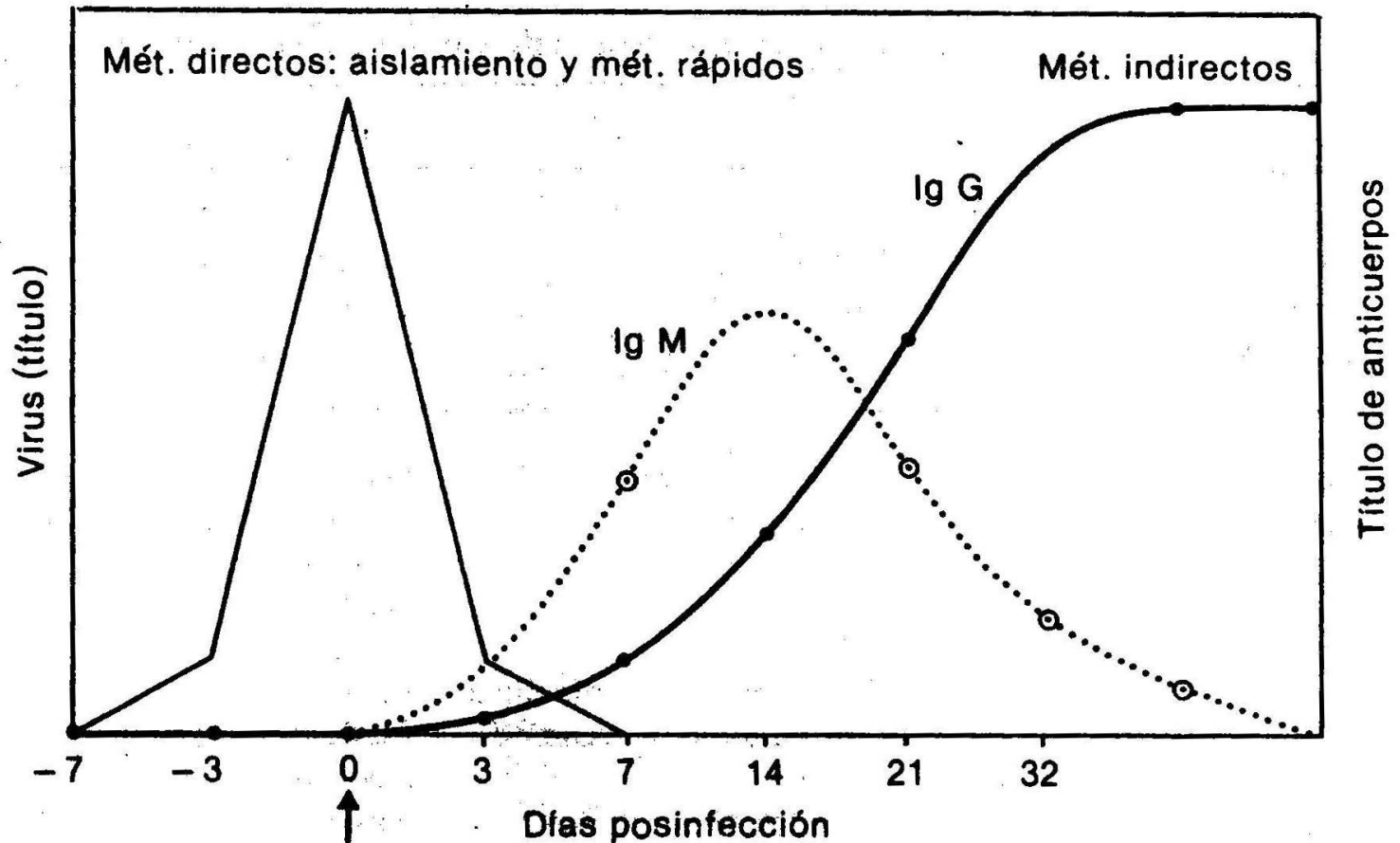
Manifestaciones	Agentes	Muestras
Infección del SNC	EV, HSV, Rabia, Sarampión, Arbovirus	LCR, orina, sangre
Infección respiratoria baja	Influenza, Parainfluenza, Sincicial respiratorio, ADV	ANF
Infección respiratoria alta	Rinovirus, Adenovirus, EV, Reovirus	H. Nasal, H. Faríngeo, ANF, heces
Piel y mucosas	Viruela, Varicela, HSV, EV	H. Faríngeo, raspado base vesícula
Exantéma	Rubeóla	Sangre heparinizada, LCR, H. Faríngeo
Conjuntivitis	HSV, Adenovirus, EV70	H. Ocular
Sistémica	CMV, Adenovirus, CAV-B	Orina, sangre, H. Faríngeo, LCR
Diarrea infantil	Rotavirus	Materia fecal
Hepatitis, SIDA	HAV, HBV, HIV	Suero

Recolección y Conservación

Muestra	Recolección
Suero, sangre entera, plasma, leucocitos	3-10 ml, tubo estéril
Hisopados	Tubo con medio de transporte
Fluidos	Tubo estéril
Biopsias y necropsias	Tubo estéril con medio de transporte
LCR	Tubo estéril
Materia Fecal	4 grs, frasco limpio

Conservar en frío (4°C). Evitar el congelamiento y descongelamiento. Procesar en forma inmediata.

Curvas de detección de virus y Ac



Métodos de Diagnóstico Directos

- Detectan la presencia de virus en muestras clínicas.
 1. Detección del virus como agente infeccioso: **Aislamiento viral**
 2. Detección de partícula viral: **Microscopía electrónica**
 3. Antígenos virales: **IF, IP, EIA**
 4. Genomas virales: **PCR, rtPCR.** Métodos moleculares

Aislamiento Viral

- Es el método de diagnóstico clásico.
- Es un sistema de amplificación, que incrementa la cantidad de virus presente en la muestra.
- Producto: virus viable.
- La cepa aislada puede conservarse. Permite la posterior caracterización del virus.
- Permite la detección de diferentes agentes virales, incluso aquellos no sospechados inicialmente.

Tipo de cultivo	Línea celular	Virus
Primario	Riñón de mono	Influenza, Parainfluenza, EV
	Riñón de conejo	HSV
	Riñón de embrión humano	ADV, EV
Diploide	Fibroblastos	HSV, CMV, VZV, ADV, RSV, PAR, BK, Rinovirus
Continuos	Hep-2	ADV, HSV, PAR, RSV, Parainfluenza y EV (algunos)
	A549	HSV, ADV, EV
	MDCK	Influenza
	Vero	HSV, VZV, PAR
	Rd	Polio, Echo, CAV
	L20b	Poliovirus

Efecto Citopático (ECP)

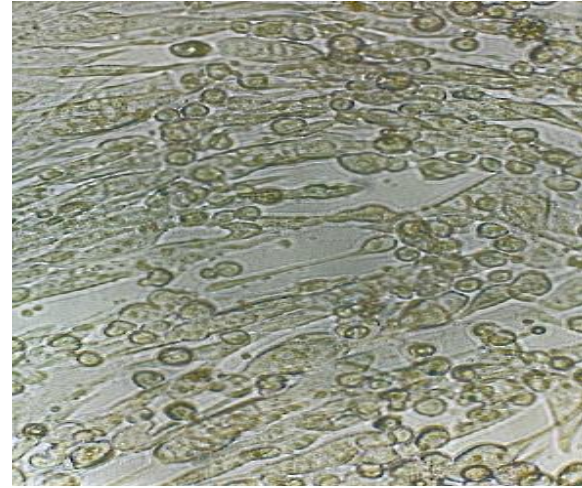
ECP: es el cambio morfológico producido en las células infectadas que puede visualizarse microscópicamente.

- ✓ Cuerpos de inclusión
- ✓ Células multinucleadas
- ✓ Sinsicios celulares
- ✓ Vacuolización citoplasmática

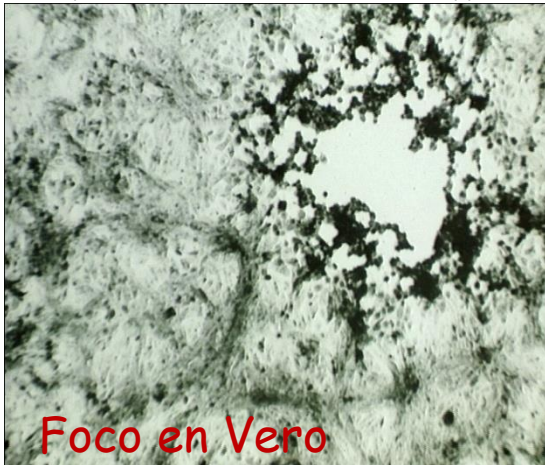
ECP HSV



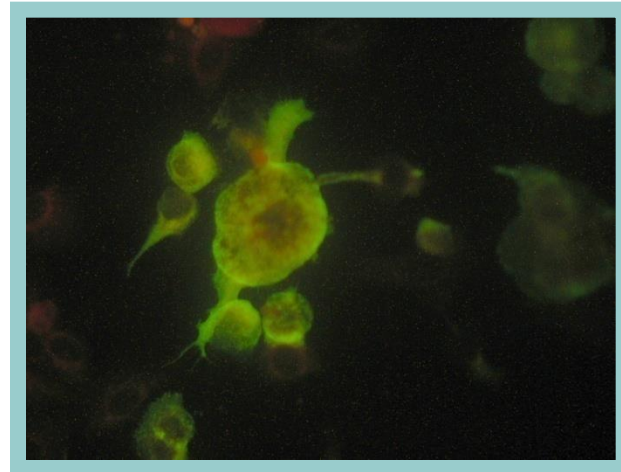
Fibroblastos normales



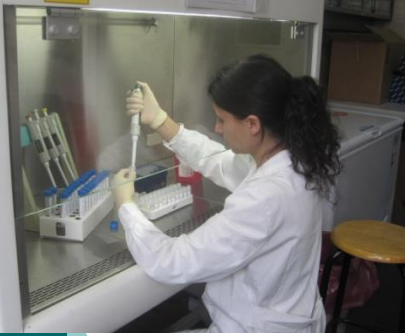
Fibroblastos infectados con HSV



Foco en Vero



Desventajas



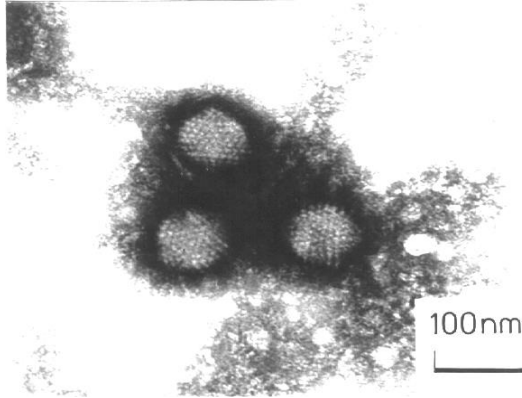
- **Baja sensibilidad**
- Deben utilizarse combinaciones de líneas celulares.
- Siempre requiere **confirmación**.
- Existen virus que son difíciles de aislar (CAV) ó son de lento crecimiento (CMV).
- **Demora de resultados:** 6 ó 7 días hasta 14 días o más.
- Laboriosa, personal altamente entrenado, infraestructura especial de laboratorio.
- Se debe trabajar en condiciones de esterilidad (cabina con flujo de aire laminar).

Microscopía electrónica

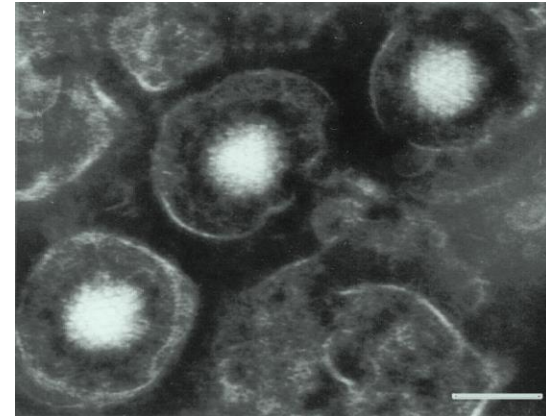
- Visualización directa de partículas virales en muestras
- Rápido
- No requiere virus viable
- Procedimiento abierto
- Costo y el mantenimiento del microscopio electrónico es complejo
- Sensibilidad: relacionada con la alta concentración de partículas virales (10^5 a $10^6/L$)
- **Usos:** - Muestras de materia fecal en gastroenteritis virales. Ej: Rotaviruses, Adenovirus 40 y 41, Norovirus y Astroviruses.
 - Líquido de ampollas: HSV, Poxvirus, Ebola
 - tejidos fijados obtenidos por biopsia o autopsia
 - identificación de virus en cultivos celular

Fotografía electrónica de virus entéricos

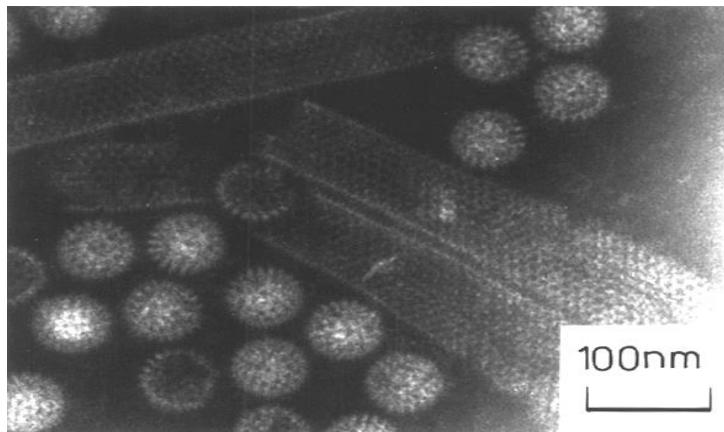
ADENOVIRUS



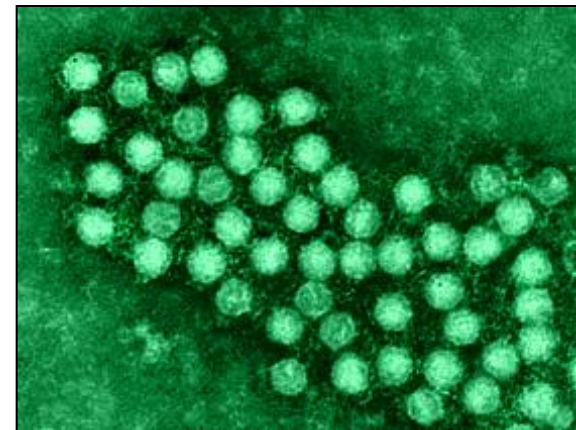
HERPESVIRUS



ROTAVIRUS



ENTEROVIRUS



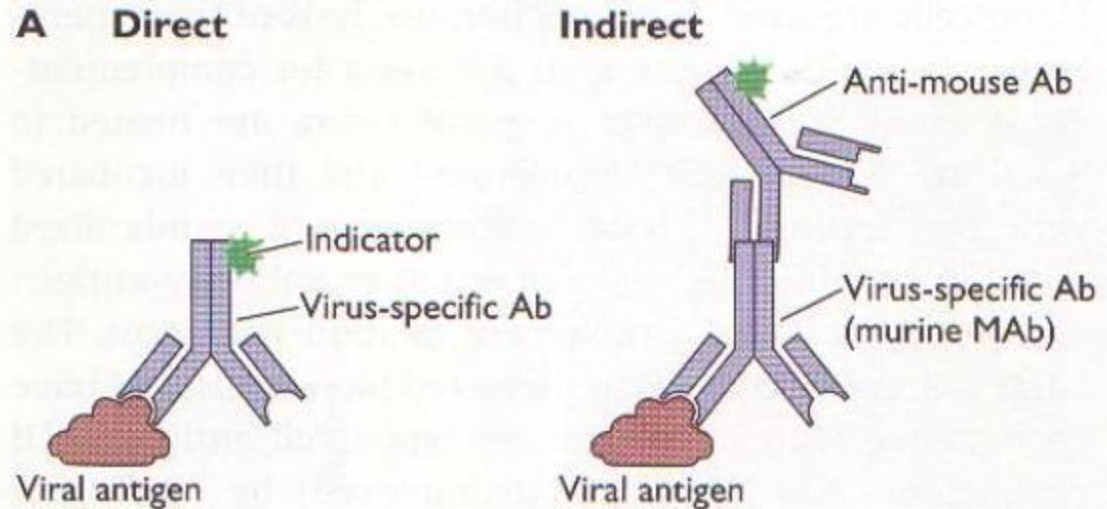
Métodos: Inmunofluorescencia

Inmunofluorescencia (IF): isotiocianato de fluoresceína (FITC)

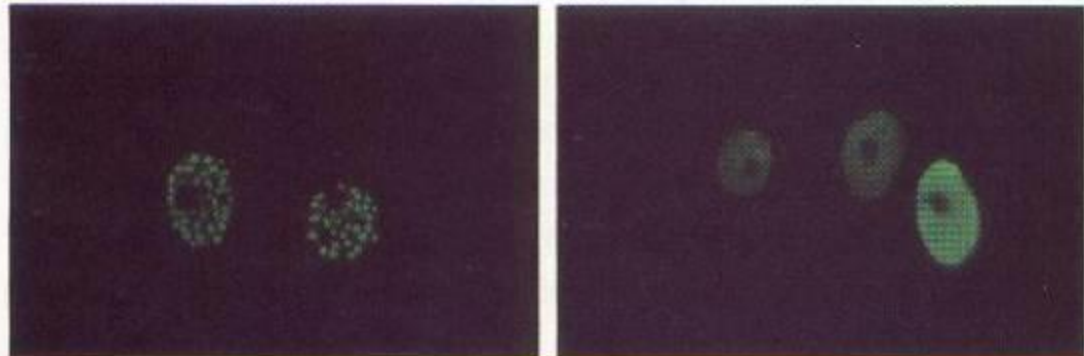
- **Directa:** Fácil de usar, conjugación de cada Ac antiviral

- **Indirecta:** Más sensible y más versátil.

- Microscopio de fluorescencia (luz UV)

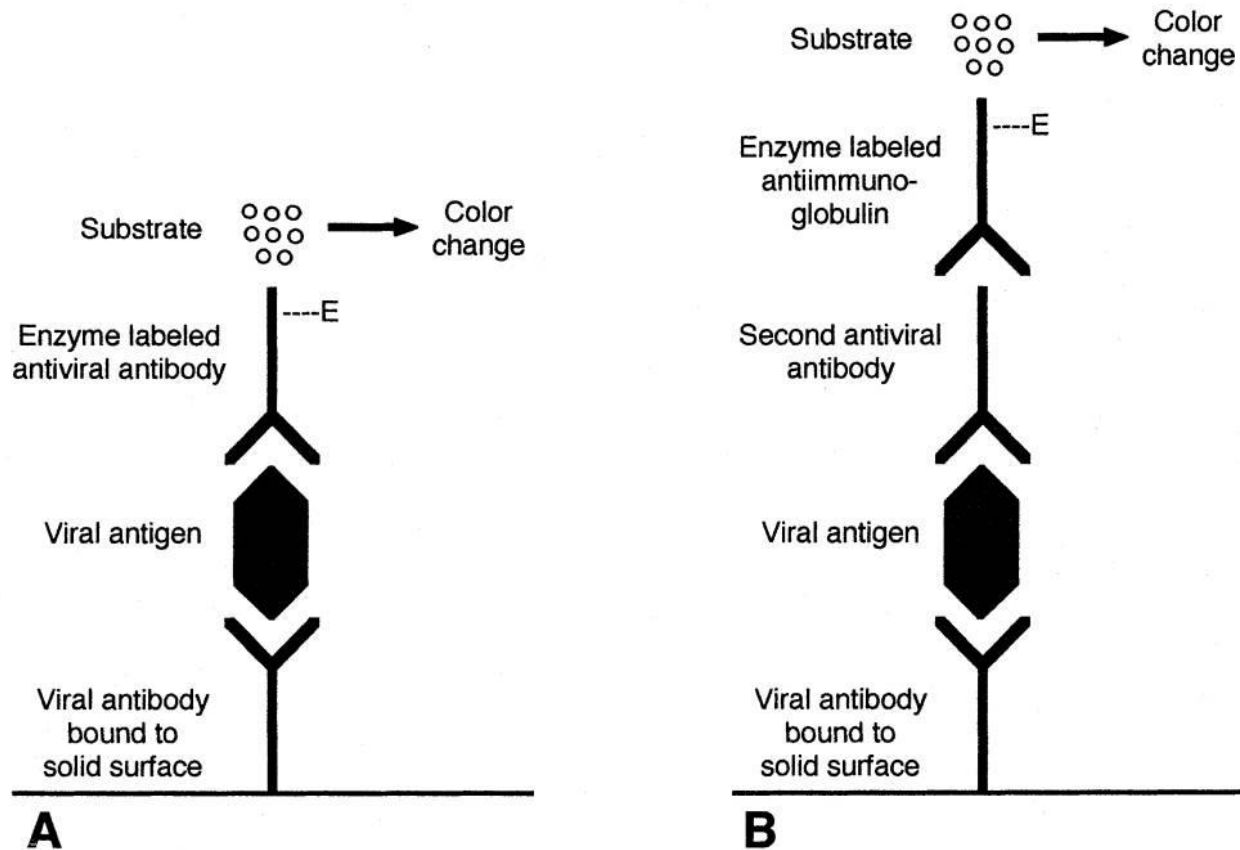


B



Métodos: ELISA

3. Enzima Inmunoensayo



Formato de anticuerpos doble sandwich
Cambio de color indica presencia de antígeno del virus

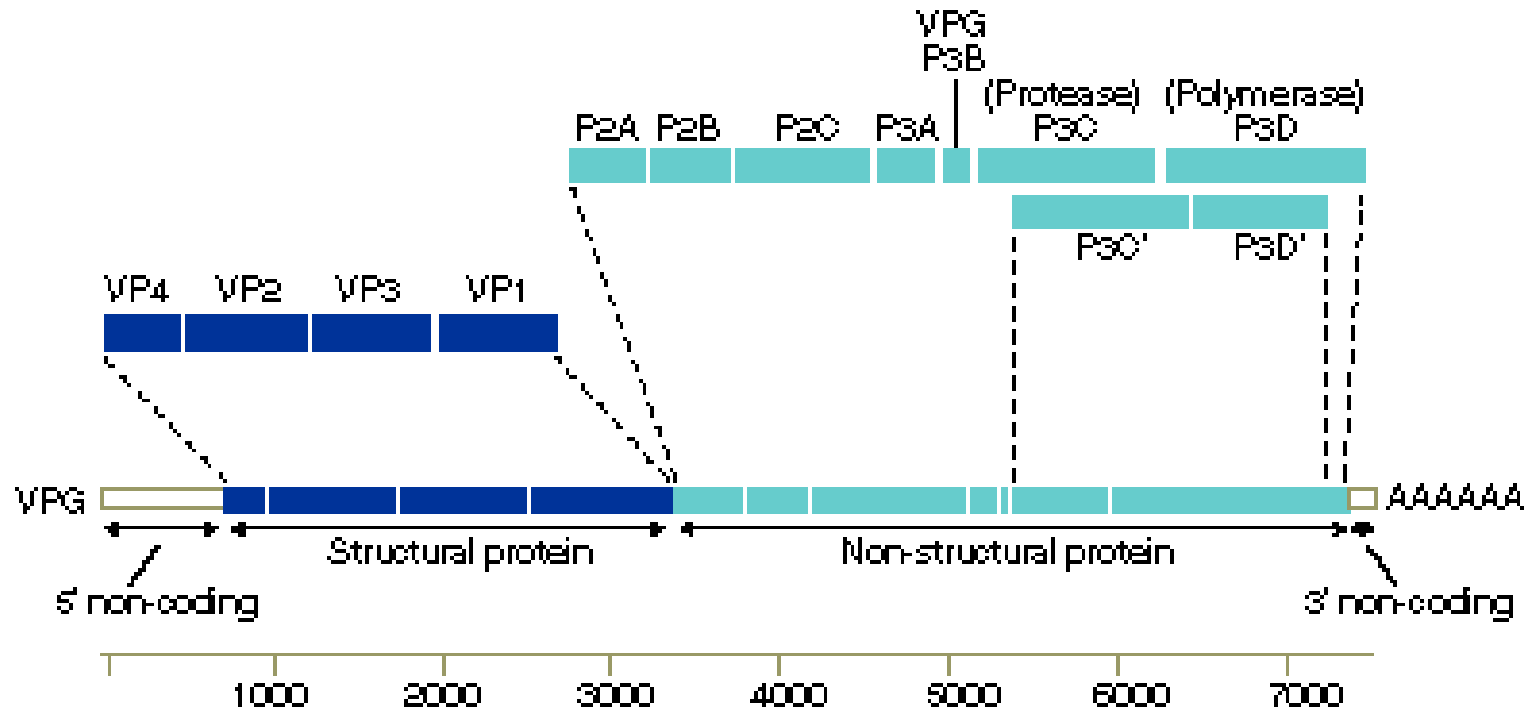
Propiedades detección Ag

- Versátil
- En fase sólida o líquida.
- Integridad de la muestra no es tan importante, ventajoso para transporte de muestra prolongado.
- Aplicación a muestras diversas
- Posibilidades de automatización.
- Instrumentos de laboratorio están disponibles que puede realizar EIA para detectar tanto antígenos o anticuerpos.

Aplicaciones de detección de Ag

Muestra	Virus
Respiratorias (ANF, HF, H Nasal, BAL)	Respiratorio sincicial Influenza A,B Parainfluenza 1,3 Adenovirus Parotidítis
Piel o hisopado mucosa	HSV, VZV
Conjuntiva o hisopado cornea	HSV, ADV
Sangre	CMV (pp65) HBV (Ag superficie) HIV (p24)
Materia Fecal	Rotavirus Adenovirus (entérico)

Genoma virales: el blanco para métodos moleculares

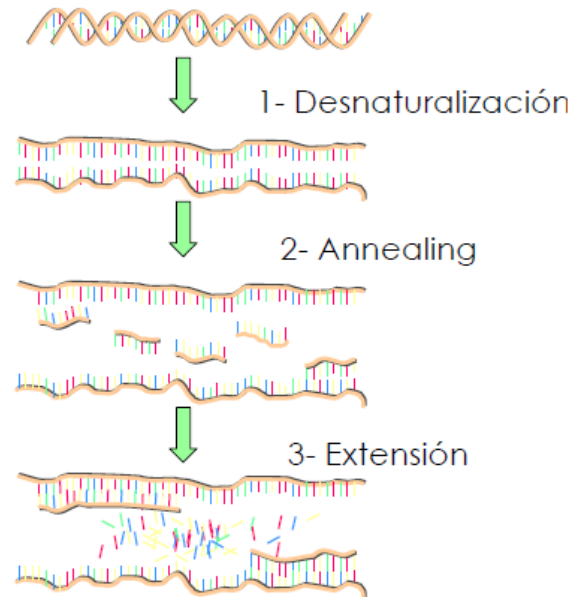
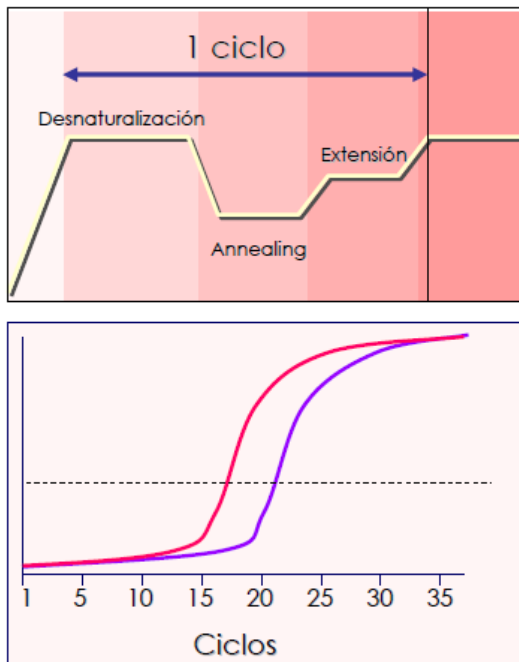


Organisation of the poliovirus genome

Expert Reviews in Molecular Medicine © 1999 Cambridge University Press

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

Amplificación enzimática in vitro de un fragmento de ADN ó ARN en forma exponencial.

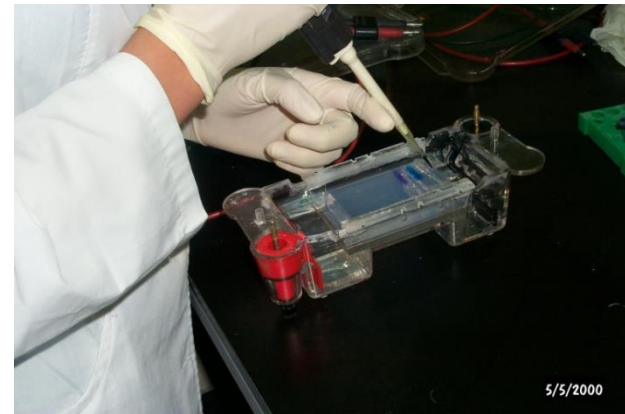


- Proceso repetitivo de ciclos
- Cada paso se produce a una temperatura determinada

Formatos de PCR

- **RT-PCR:** Virus RNA:
 - Retrotranscripción: ARN a ADNc (37 o 42 °C)
- **Nested:** reacción de PCR anidada. Mayor sensibilidad.
- **Múltiplex PCR:** permite la detección de diferentes virus en una única reacción. Los fragmentos amplificados deben tener tamaños diferentes.

Etapas de la PCR



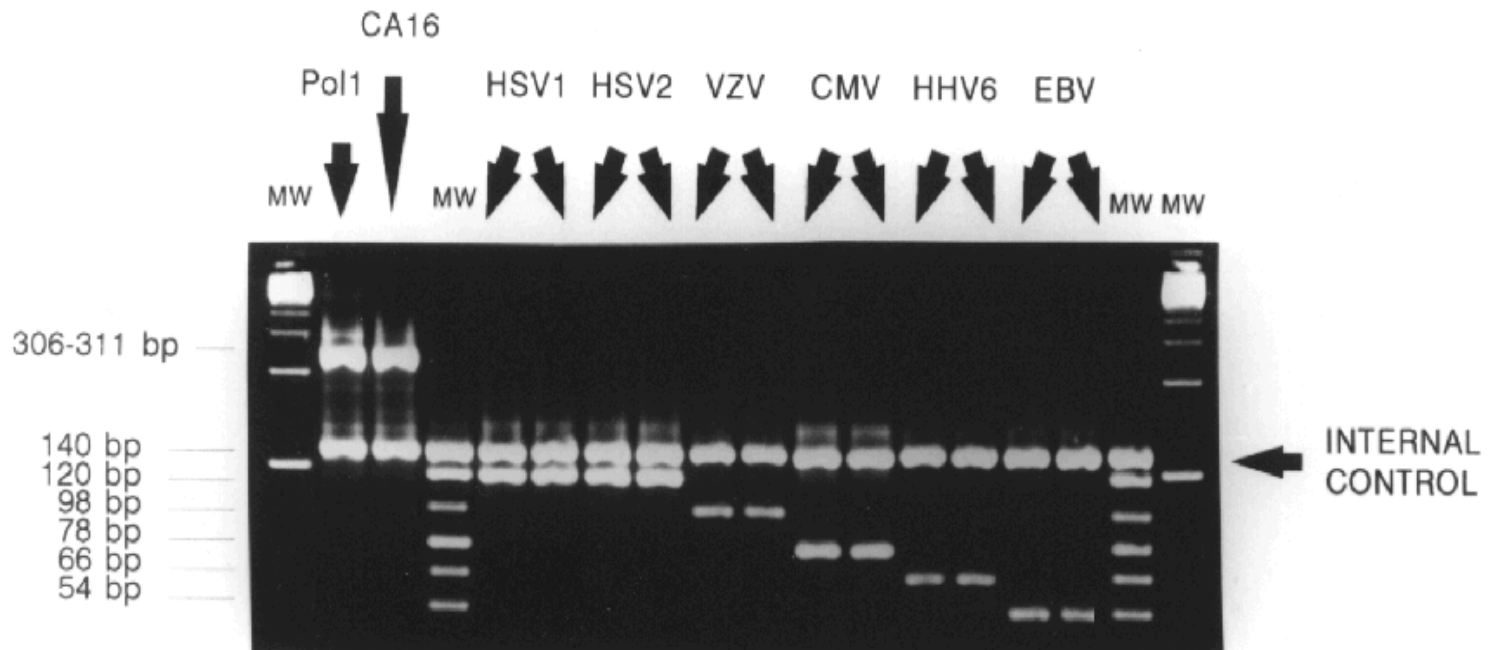
Ventajas de la PCR

- Rápida: resultados en el día
- Elevada sensibilidad y especificidad
- No requiere la viabilidad del virus

Desventajas de la PCR

- ◆ RNA es fácilmente degradable
- ◆ Inhibición de la reacción (falsos negativos)
- ◆ Contaminación (falsos positivos)

PCR Multiple Virus Neurotrópos



Blancos amplificados: DNA polimerasa (HSV) y 5'NCR (EV)

Sensibilidad: - HSV, EBV: 1-5 moléculas

- VZV: 5-50 moléculas

- CMV, HHV6: 50-100 moléculas

- EV: 0.01 - 0.001 TCDI₅₀

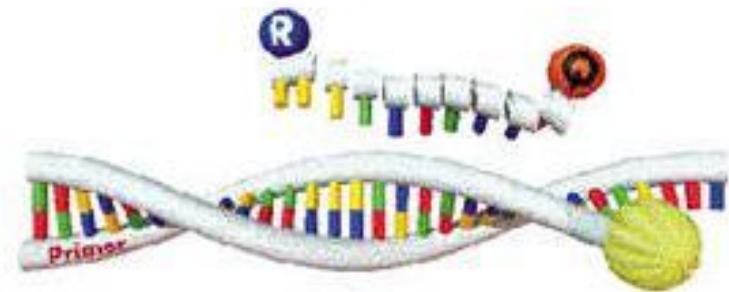
PCR en Tiempo Real

- PCR: procesos de amplificación y detección ocurren en forma simultánea.
- Detección: mide fluorescencia emitida, la cual es proporcional al ADN sintetizado.
- Sistemas fluorescentes:
 - Agentes intercalantes: SYBER Green I
 - Sondas específicas marcadas con fluorocromos: Taq Man

TAQ MAN



1. Specific annealing of the probe and PCR primer



DNA-Polymerase

2. Primer-extension and hydrolysis of the probe

3. Release of the probe

LASER



4. Signal increases in proportion to the number of cycles

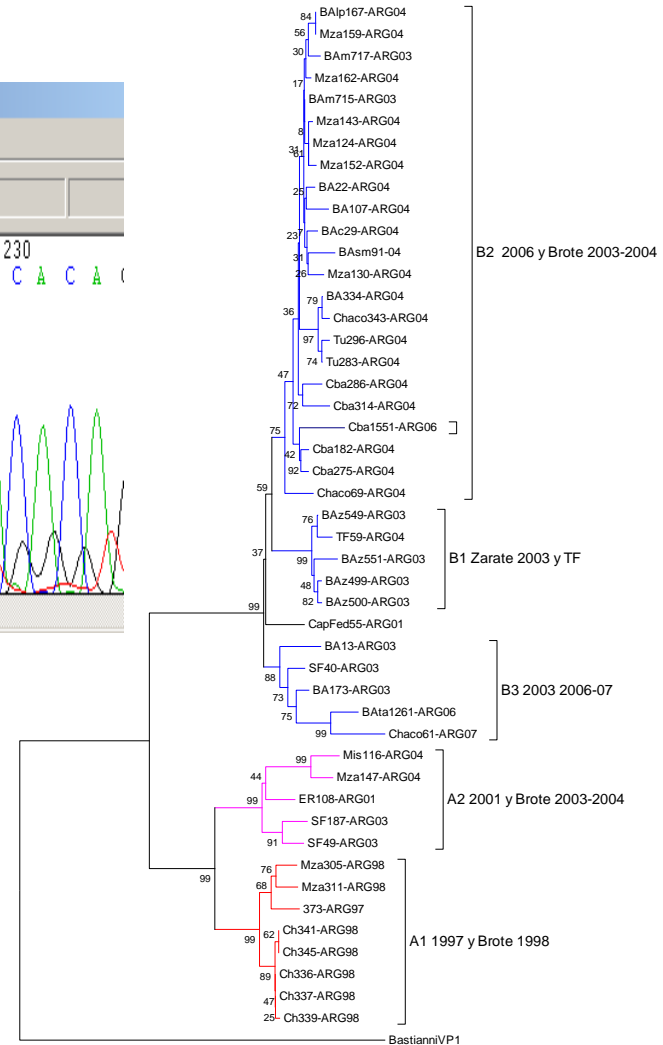
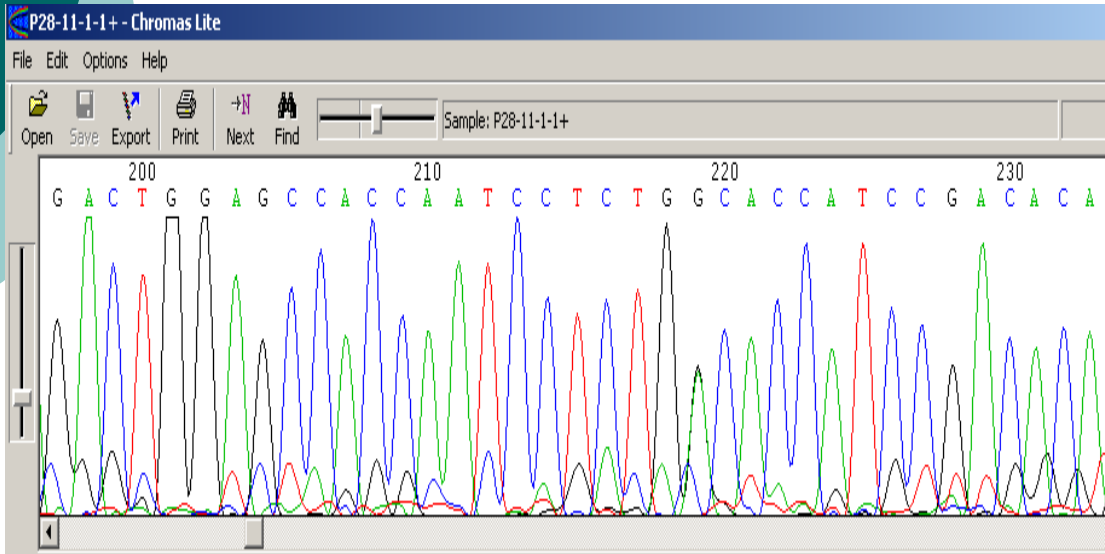
Características de PCR Tiempo Real

- **Detección en tiempo real** del producto amplificado.
- Sistema de amplificación y detección integrados.
- Bajo riesgo de contaminación, sin manipulación post-amplificación
- **Cuantitativa**
- Rápida
- Reproducible
- **Altamente específica: iniciadores y sonda**
- No utiliza Bromuro de Etidio
- Fácil de automatizar
- **Sensibilidad similar a Nested-PCR**
- Reactivo dependiente
- Costo

Secuenciación genómica viral

- Secuenciación nucleotídica a partir de productos de PCR
- Detección de resistencia a los antivirales en VIH (plasma) y CMV
- Identificación de serotipos: EV
- Detección de cepas mutantes: cepas derivadas de la vacuna Sabin con capacidad patogénica.
- Detección de cepas recombinantes
- Aplicaciones epidemiológicos

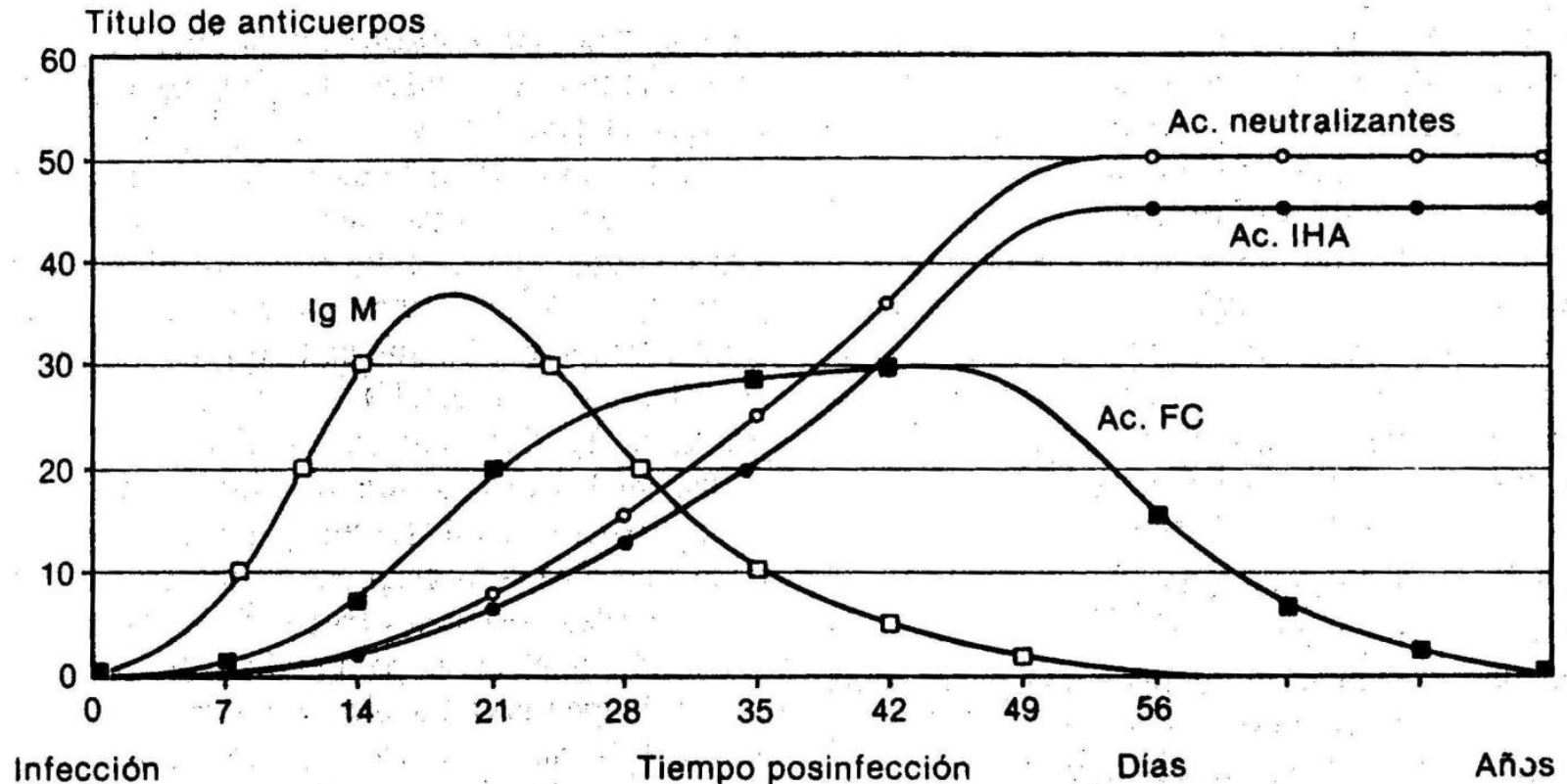
Relaciones filogenéticas



Métodos de Diagnóstico Indirectos

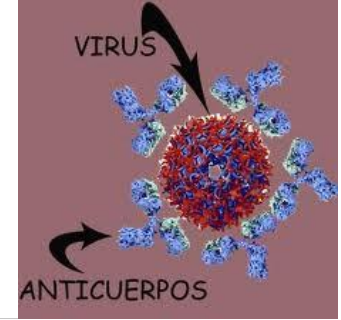
- **Serología:** detección de anticuerpos específicos antivirales en el suero del paciente.
- **Conversión serológica:** aparición o aumento de 4 o más veces del título de Ac entre 2 muestras pareadas de suero, fase aguda y convalescente (14 a 21 días). IgG.
- Presencia de **IgM específica:** en una sola muestra de período agudo o convalescencia temprana
- **ELISA, RIA, Western Blot**

Serología: Curva de detección de Ac



Diagnóstico serológico se basa en la cinética de la respuesta de Ac a la infección viral.

Aplicación de la serología



Infección aguda	Estado inmune
Epstein-Barr	Varicela Zoster
Citomegalovirus (S. Mononucleosis)	Herpesvirus
Hepatitis viruses (A-B)	Citomegalovirus
Paperas	Epstein Barr
Rubéola	Paperas
Parotiditis	Rubéola
Parvovirus B19	Parotiditis
Encefalitis virus	Parvovirus B19
Rabia	Hepatitis viruses (A-B)
Fiebre Hemorrágica	
Dengue	
HIV	
HTLV-1/2	

Bibliografía

- Fields Virology 5 edición. Lippincott Williams-Wilkins
- [www.who/int/es](http://www.who.int/es)
- www.paho.org
- www.cdc.gov
- www.msal.gov.ar
- www.anlis.gov.ar