

DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VÍRUS DO GRUPO HERPES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA: — OBSERVAÇÕES ATÍPICAS NAS AMOSTRAS DE PACIENTES AIDÉTICOS.

Marli UEDA*
Hatune TANAKA*
Jonas José KISIELIUS*
Paulo Pinto JOAZEIRO*

RIALA6/710

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J. & JOAZEIRO P. P. — Diagnóstico rápido de vírus do grupo Herpes por microscopia eletrônica — observações atípicas nas amostras de pacientes aidéticos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):57-62, 1991.

RESUMO: A Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz recebeu no período de 1986-90, 129 amostras de materiais biológicos (líquido vesicular, raspado de lesão genital, raspado de lesão anal, saliva e urina) de pacientes aidéticos, com suspeita de infecção herpética, para diagnóstico rápido de vírus do grupo Herpes, por microscopia eletrônica. Dessas amostras, 25% (32/129) foram positivas para vírus Herpes, com algumas apresentando aspectos atípicos, tais como: a) grande quantidade de partículas virais; b) detecção de mais de um nucleocapsídeo num mesmo envoltório; e c) detecção de grandes agregados de nucleocapsídeos sem envoltórios.

Estas observações poderiam ser atribuídas às características de imunodepressão desses pacientes e a sua divulgação foi por nós considerada importante, pois seriam dados adicionais para o estudo de infecções virais, nesses pacientes imunodeprimidos.

DESCRITORES: — Herpesvírus, Microscopia Eletrônica, Infecção Oportunista

INTRODUÇÃO

O uso da microscopia eletrônica para a detecção de partículas virais é um dos métodos utilizados para o diagnóstico rápido de vírus^{1,10,11}.

O diagnóstico rápido de vírus proporciona a identificação etiológica em poucas horas propiciando ao clínico, facilidade na escolha das terapêuticas e melhor atendimento ao paciente¹¹.

A Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, realiza diagnóstico rápido de vírus, desde 1967^{14,16,21} e vem ampliando o seu campo de atuação. Vírus Herpes em infecções herpéticas; Rotavírus, Adenovírus e "SRVP" ("Small Round Virus Particles") em gastroenterites; "Papovavirus-

like", Moluscum contagiosum e eventual Poxvírus em lesões cutâneas; "Parvovirus-like" em urina de pacientes suspeitos de eritema infeccioso, são alguns dos diagnósticos realizados por esta Seção.

O diagnóstico do vírus Herpes pela Microscopia Eletrônica Direta (MED) é fácil^{1,10,11,14,19}, cujas características morfológicas são: — cerne de aproximadamente 75 nm que pode ser elétron-lucente (quando o ácido nucléico-DNA está presente) ou elétron-denso (vazio, sem o ácido nucléico); um capsídeo icosaédrico contendo 162 capsômeros que circunda o cerne, medindo cerca de 100 nm e um envoltório pleomórfico de 180 a 200 nm^{2,7,9,20,25,26}.

* Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

Tal morfologia permite um diagnóstico presuntivo, pois não diferencia os tipo-específicos do vírus do grupo Herpes, que podem ser Herpes simples do tipo I, II, Varicela-zoster e Citomegalovírus. Estudo realizado por Imunomicroscopia Eletrônica utilizando anticorpo monoclonal e marcação com ouro-coloidal, permitiu a identificação entre vírus Herpes tipo I, II e Varicela-zoster²⁴. Entretanto, a diferenciação morfológica é de fundamental importância no diagnóstico diferencial entre Varicela e Vaccinia¹¹ e nas detecções de infecções herpéticas em centros cirúrgicos e berçários.

Com a disseminação da AIDS tem sido observada uma elevação na frequência de infecções oportunistas nestes doentes, incluindo-se aquelas por vírus do grupo Herpes^{8,18,23}. Na análise ultra-estrutural desses vírus, em amostras provenientes de pacientes aidsicos, foram detectadas com grande frequência aspectos atípicos.

A caracterização e divulgação destas observações incomuns foram para nós consideradas importantes e oportuna.

MATERIAIS & MÉTODOS

Foram examinadas no período de 1986-90, 129 amostras (líquido vesicular — 50, raspado de lesão anal — 48, raspado de lesão genital — 7, urina — 17 e saliva — 7) de pacientes com AIDS provenientes de toda rede hospitalar pública do Estado de São Paulo, principalmente do Hospital Emílio Ribas.

Essas amostras foram submetidas à técnica de contração negativa (Microscopia Eletrônica Direta-MED)⁴, empregando-se como contrastante o Silicotungstato de sódio 1% em pH 7.1 e examinadas num microscópio eletrônico Philips Em-400T, operando a 80 kV.

RESULTADO

Os resultados por tipo de amostra são apresentados na tabela 1.

TABELA 1.

Tabela de percentual de positividade por tipo de amostra.

TIPO DE AMOSTRAS	Nº DE AMOSTRAS	Nº DE POSITIVOS	% DE POSITIVIDADE
Líquido vesicular	50	28	56,0
Raspado de lesão anal	48	3	6,3
Raspado de lesão genital	7	1	14,3
Saliva	7	0	0
Urina	17	0	0
Total	129	32	24,8

Os aspectos da morfologia clássica do vírus do grupo Herpes descritos na literatura^{2,7,9,20,25,26} são apresentados na figura 1.

Os aspectos atípicos foram observados somente nas amostras de líquido vesicular:

— A maioria das amostras positivas (cerca de 90%) apresentaram grande número de partículas virais, predominando-se as partículas completas com ácido nucléico (figura 1) em relação às incompletas (figura 2).

— Foram detectadas mais de um nucleocapsídeo no mesmo envoltório (figura 3) em 6 das amostras positivas (6/28-21,4%).

— Grandes agregados de nucleocapsídeos (com ou sem ácido nucléico) foram observados em 2 das amostras positivas (2/28-7,1%) (figura 4).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

São descritas na literatura freqüentes ocorrências de infecções oportunistas generalizadas, causadas por vírus do grupo de Herpes em pacientes

imunodeprimidos (transplantados renais, leucêmicos, cancerosos) e também em portadores de outras síndromes causadoras de imunodeficiências como a AIDS^{5,8,13,16}. Porém, nesses estudos não são citados os aspectos atípicos do vírus Herpes, em infecções de pacientes imunodeprimidos.

Analisando os nossos resultados por tipo de amostra, podemos notar o baixo percentual de positividade nas amostras de raspados de lesão anal e genital. Em 1975, Daniels et al.⁶, demonstraram em culturas de células a presença de altos títulos de vírus Herpes tipo I, isolados de amostras colhidas por "swab", de lesões da mucosa labial. Como as amostras de lesão, por nós examinadas, eram na maioria, escarificações de lesão anal, esse baixo índice de positividade, provavelmente poderia ter ocorrido devido a dificuldades na colheita desses materiais e presença de muco, mascarando a detecção das partículas de vírus.

Quanto a exames de urina não foi observado nenhum resultado positivo, apesar de estudos reali-

zados em urina de crianças com infecções congênitas terem detectados presença de Citomegalovírus por microscopia eletrônica direta^{12,15 e 17}.

A não detecção de nenhum resultado positivo na saliva talvez se deve a pequena amostragem examinada. Lee et al, em 1978¹⁵ detectaram a presença de vírus tanto em urina como em saliva de crianças infectadas por Citomégalo vírus.

Os aspectos atípicos do vírus Herpes foram observados somente nas amostras de líquido vesicular, onde o índice de positividade foi maior. A grande quantidade de vírus e facilidade na colheita da amostra neste estágio de infecção^{9, 19}, provavelmente contribuíram para a detecção desses achados.

Os nossos resultados apresentam características peculiares como a detecção de grandes quantidades de partículas virais, predominando as partículas completas com a presença do DNA viral (figura 1) e a presença de dois ou mais nucleocapsídeos num mesmo envoltório (figura 3). Normalmente nos diagnósticos de rotina, a maioria das partículas virais são incompletas, apresentando capsídeos vazios, com contrastante no seu interior e muito raramente

são detectados dois ou mais nucleocapsídeos num mesmo envoltório. Os grandes agregados de nucleocapsídeos sem envoltórios (figura 4), foram observados apenas em amostras de pacientes aids.

Estudos anteriores realizados por Bauer et al., em 1988³, mostraram em cortes ultra-finos de autópsia de pulmão de paciente com AIDS, células alveolares infectadas por citomegalovírus. O citoplasma dessas células revelaram partículas de vírus completas e incompletas, isoladas, no interior de materiais densos ou ainda agrupadas no interior de vacúolos, que poderiam dar origem às formações atípicas dos vírus Herpes por nós observadas com o emprego da contrastação negativa.

A grande frequência dessas detecções atípicas do vírus do grupo Herpes poderiam ser atribuídas a imunodepressão desses pacientes^{13,18,22} e a divulgação destes aspectos incomuns seriam dados adicionais para o estudo de infecções virais em pacientes imunodeprimidos.

Estudos futuros serão realizados visando a compreensão dessas alterações aqui caracterizadas.

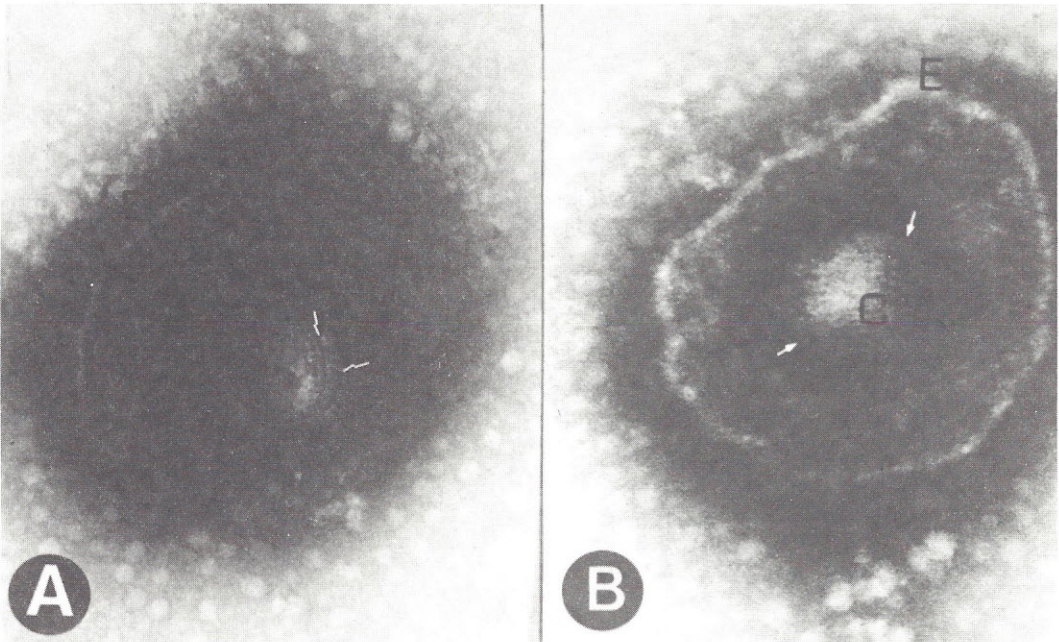


FIGURA 1

Morfologia clássica de vírus do grupo Herpes. Em A, as setas indicam a presença de enovelado do ácido nucléico-DNA no interior do capsídeo. Em B, as estruturas do capsídeo estão mais claramente evidenciadas. As setas apontam os capsômeros que compõem o capsídeo.

E-envoltório C-nucleocapsídeo Aumentos: — A-210.000x; B-225.000x

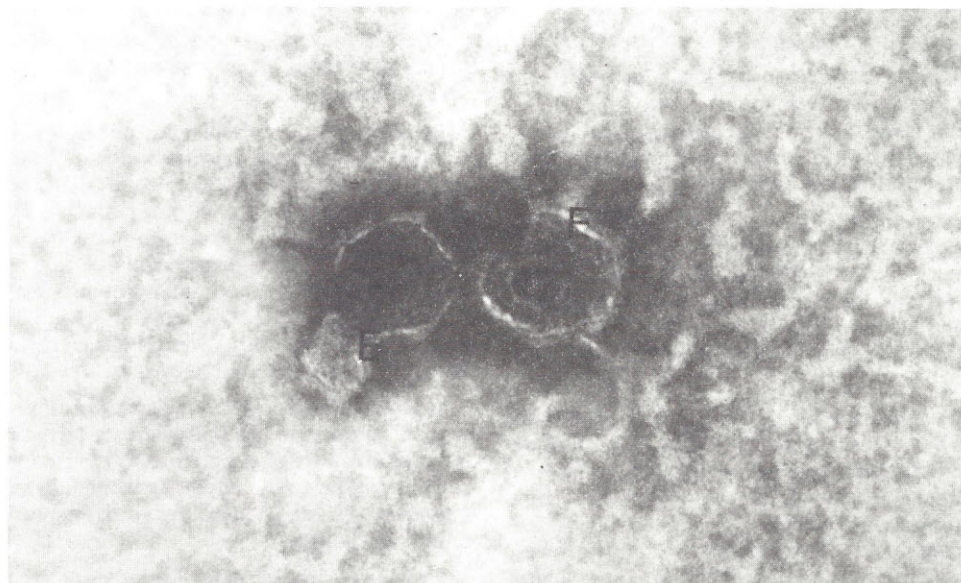


FIGURA 2

Partículas de vírus do grupo Herpes incompletas (sem ácido nucléico).

E-envoltório C-cápside vazio sem ácido nucléico Aumento: — 78.000x

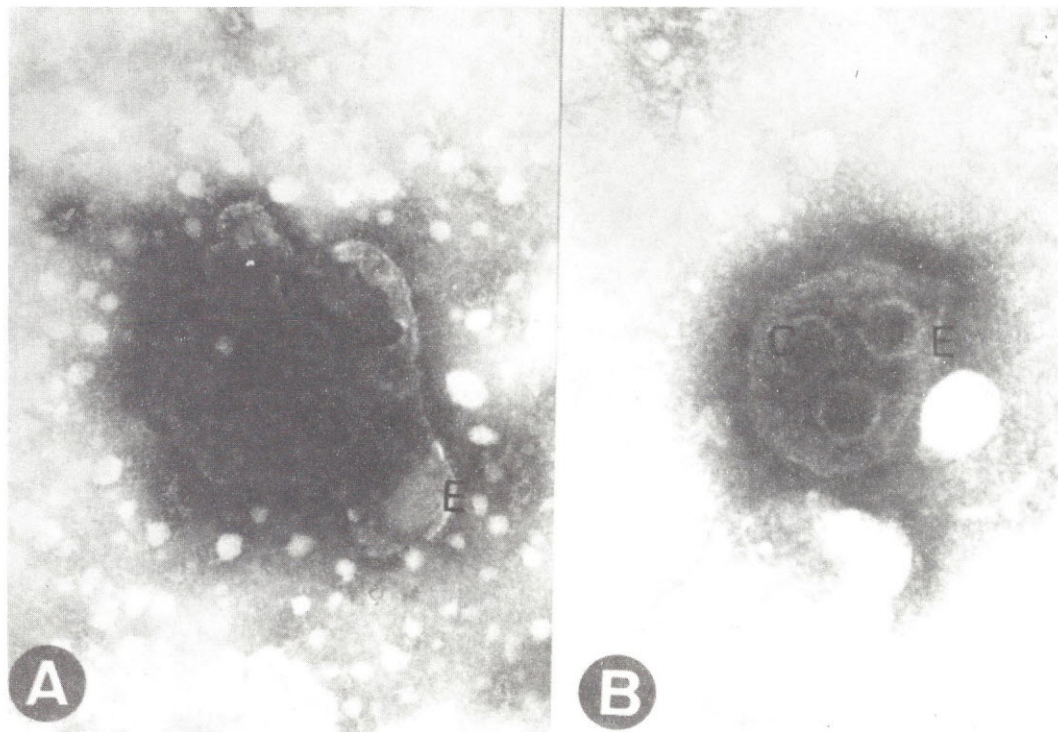


FIGURA 3

Partículas de vírus do grupo Herpes. Em A, com dois nucleocapsídeos e em B com três, num mesmo envoltório.

E-envoltório C-cápside Aumentos: — A-115.000x; B-82.000x

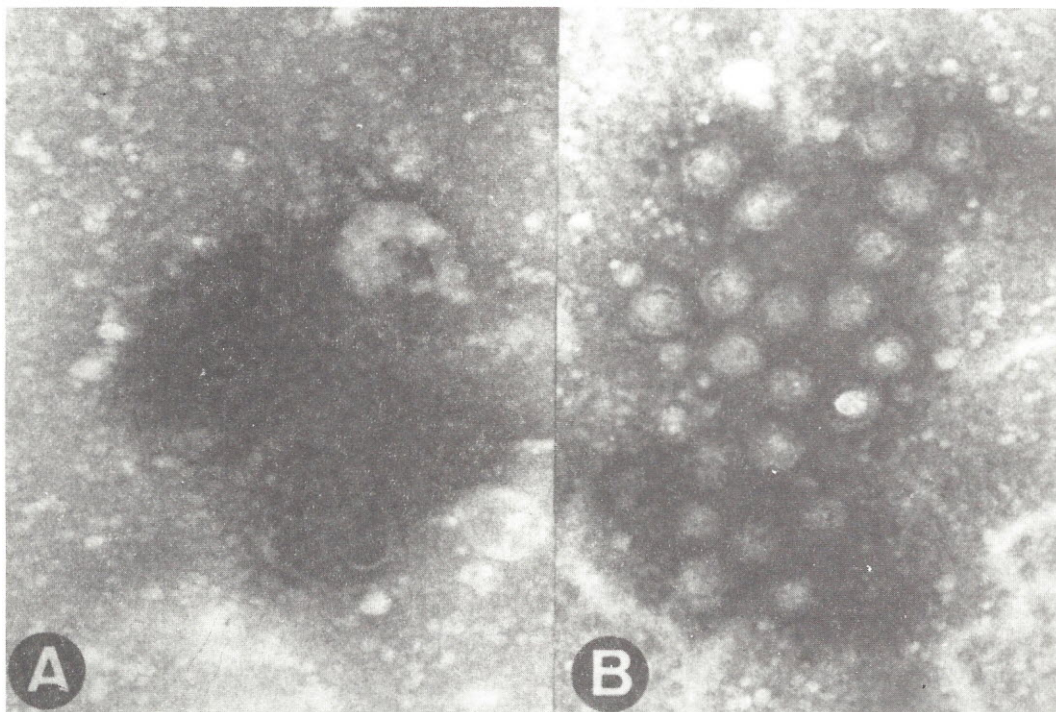


FIGURA 4

Agregados de nucleocapsídeos sem envoltórios, de vírus do grupo Herpes. Em A, capsídeos vazios (sem ácido nucléico) e em B, note-se um grande número de capsídeos com ácido nucléico.

Aumentos: — A-82.000x; B-84.000x

RIALA6/710

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J. & JOAZEIRO P. P. — Rapid diagnosis of Herpesvirus group by electron microscopy: — Atypical observations in the samples of patients with AIDS. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):57-00, 1991.

ABSTRACT: The Electron Microscopy Section of Institute Adolfo Lutz received 129 biological samples (vesicle fluid, genital and anal scrapies lesions, saliva and urine) of patients with AIDS, suspected Herpesvirus infection, in the period of 1986-90, for rapid virus diagnosis by Electron Microscopy. From those samples, 25% (32/129) were positive to Herpesvirus, which some detections showed atypical aspects, such as: — a) great quantity of virus particles; b) detection of two or more nucleocapsids in the same envelope; and c) detection of great aggregates of nucleocapsids without envelopes. This observation could be attributed the immunedepression characteristics of those patients. This relate is considered important by us because it could represent additional dates to study the virus infection in patients with AIDS.

DESCRIPTORS: — Herpesvirus, Electron Microscopy, Opportunistic infection

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. D. — Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 104: 147-58, 1983.
2. ALMEIDA, J. D.; HOWATSON, A. F. & WILLIAMS, M. G. — Morphology of varicella (chicken-pox) virus. *Virology*, 16: 353-5, 1962.
3. BAUER, P. G.; FIALHO, F.; OLIVEIRA, C. A. B.; VALLE, H. A.; SION, F. S. & SA, C. A. M. — Cytomegalovirus in the lung of AIDS. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4., São Lourenço, MG, 1988. *Resumos*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1988. p. 53.
4. BRENNER, S. & HORNE, R. W. — A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta.*, 34: 103-10, 1959.
5. COREY, L. & SPEAR, P. G. — Infections with Herpes simplex viruses (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 314(11): 686-91, 1986.
6. DANIELS, C. A.; LEGOFF, S. G. & NOTKINS, A. L. — Shedding of infectious virus/antibody complexes from vesicular lesions of patients with recurrent Herpes labialis. *Lancet*, 20: 524-8, 1975.
7. DOANE, F. W. & ANDERSON, N. Herpesviridae. In: *Electron microscopy in diagnostic virology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1987. p. 75-7.
8. DREW, W. L. — Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J. infect. Dis.*, 158: 449-56, 1988.
9. DULBECCO, R. & GINSBERG, J. S. — Herpesviruses. In *Virology*. Philadelphia, Harper & Row, 1980. p. 1061-76.
10. FIELD, A. M. — Diagnostic virology using electron microscopy techniques. *Adv. Virus Res.*, 27: 1-69, 1982.
11. GARDNER, P. S. — Rapid virus diagnosis. *J. gen. Virol.*, 36: 1-29, 1977.
12. HENRY, C.; HARTSOCK, R. J.; KIRK, Z. & BEHRER, R. — Detection of viruria in cytomegalovirus-infected infants by electron microscopy. *Am. J. clin. Pathol.*, 69: 435-9, 1978.
13. KIRCHNER, H. Role of immunosuppression in HSV: induced disease. In *Immunobiology of infection with Herpes simplex virus*. Basel, Karger, 1982. p. 22-6 (Monographs in virology, 13).
14. KISIELIUS, J. J.; TANAKA, H.; WEIGL, D. R.; UEDA, M. & JOAZEIRO, P. P. — Diagnóstico rápido de vírus do grupo Herpes pela técnica de coloração negativa. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4., São Lourenço, MG, 1988. *Resumos*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1988. p. 216.
15. LEE, F. K.; NAHMAS, A. J. & STAGNO, S. — Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in infants by electron microscopy. *N. Engl. J. Med.*, 299: 1266-70, 1978.
16. LEITE, J. B. F. L.; MARQUES, A. F.; CIARLINI, M. I.; UEDA, M. & WEIGL, D. R. — Diagnóstico pela microscopia eletrônica do vírus Herpes zoster em pacientes oncológicos. *Rev. paul. Med.*, 93: 101-3, 1979.
17. MONTPLAISIR, S.; BELLONCIK, S.; LEDUC, N.; ONJI, P. A.; MARTINEAU, B. & KURSTAK, E. — Electron microscopy in the rapid diagnosis of cytomegalovirus: ultrastructural observation and comparison of methods of diagnosis. *J. infect. Dis.*, 125: 533-8, 1972.
18. QUINNAN, G. V. Jr.; MASUR, H.; ROOK, A. H.; ARMSTRONG, G.; FREDERICK, W. R.; EPSTEIN, J.; MANISCHEWITZ, J. F.; MACHNER, A. M.; JACKSON, L.; AMES, J.; SMITH, H. A.; PARKER M.; PEARSON, G. R.; PARRILLO, J.; MITCHELL, C. & STRAUS, S. E. — Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*, 252: 72-7, 1984.
19. RAWES, W. E. — Herpes simplex virus types 1 and 2 and Herpesvirus simiae. In: LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J. ed. *Diagnostic procedures for: viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, APHA, 1979. chap. 11, p. 138.
20. ROIZMAN, B. — Herpesviridae: a brief introduction. In: *Virology*; edited by B. N. Fields et al. 2nd e. New York, Raven Press, 1990. chap. 64, p. 1787-93.
21. SALLES-GOMES, L. F.; CONCEIÇÃO, B. C.; GALLIZI, Y. D.; FONSECA, Y. M.; WEIGL, D. R. & FIGUEIREDO, M. E. F. — Variola: diagnóstico etiológico de 1967-70, no Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 5-12, 1971.
22. SCHOOLEY, R. T. — Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev. infect. dis.*, 12 (7): S 811-9, 1990.
23. TOMITA, T.; CHIGA, M.; LENAHAN, M. & BALACHANDRAN, N. — Identification of cytomegalovirus infection in acquired immunodeficiency syndrome. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 416: 497-503, 1990.
24. VREESWIJK, J.; FOLKERS, E.; WAGNAAR, F. & KAPSENBERG, J. B. — The use of colloidal gold immunoelectron microscopy to diagnose varicella-zoster (VZV) infections by rapid discrimination between VZV, HSV-1 and HSV-2. *J. virol. Methods*, 22: 255-71, 1988.
25. WILDY, P.; RUSSEL, W. C. & HORNE, R. W. — The morphology of Herpesvirus. *Virology*, 12: 204-22, 1960.
26. WRIGHT, H. T. Jr. & GOODHEART, C. R. — Human cytomegalovirus morphology by negative staining. *Virology*, 23: 419-24, 1964.