

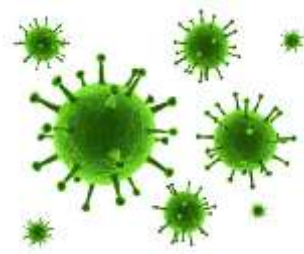
Métodos de Diagnóstico e Controle Viroológico



Prof. Rafael B. Varela
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Instituto Biomédico
Universidade Federal Fluminense



Diagnóstico Viroológico



Por que e quando solicitar diagnóstico virológico?

- Auxílio no diagnóstico clínico: determinação do agente causal em casos de infecções humanas, animais e plantas.
- Verificar resposta vacinal.
- Vigilância epidemiológica: ex: febre amarela → diagnóstico clínico de um caso suspeito deve ser confirmado em laboratório.
- Estudos epidemiológicos: conhecer a prevalência de uma determinada virose.
- Iniciar tratamento específico: Herpesvírus, HIV, HCV
- Triagem de doadores de sangue e órgãos : Hepatite B e C, HIV



DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO



Diagnóstico clínico

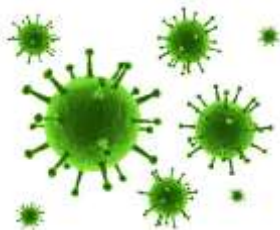
Diagnóstico laboratorial

Métodos diretos

- Isolamento viral
- Pesquisa de antígenos
- Pesquisa do genoma viral
- Microscopia eletrônica

Métodos indiretos

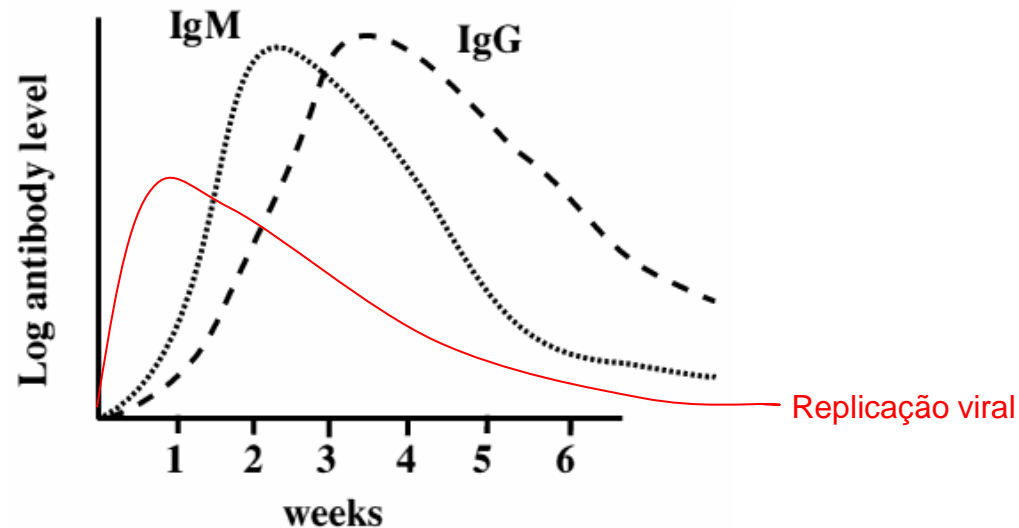
- Pesquisa de anticorpos





Amostras clínicas

O que coletar? - depende da suspeita clínica e da fase da doença



Fase aguda: fase sintomática presente nos primeiros dias da doença. Há replicação viral e, em muitos casos, ainda não houve produção de anticorpos.

- Pesquisa de vírus, antígenos ou genoma viral na amostra clínica.
- Coletar da amostra clínica depende do tropismo do vírus suspeito.

Após fase aguda: coleta de sangue para pesquisa de anticorpos (sorologia).

Amostras clínicas



Métodos Clássicos de Diagnóstico Viroológico

1. Isolamento do vírus a partir da amostra clínica em sistemas hospedeiros: PADRÃO OURO



- Animais de laboratório (desuso)



- Cultivo celular

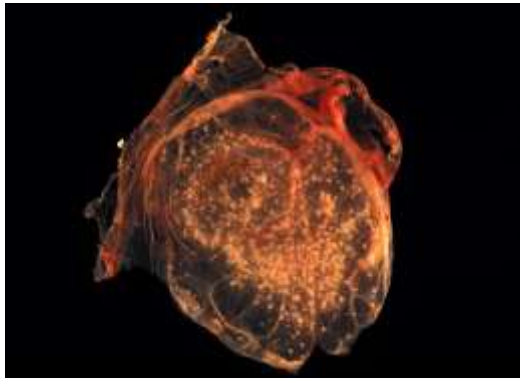
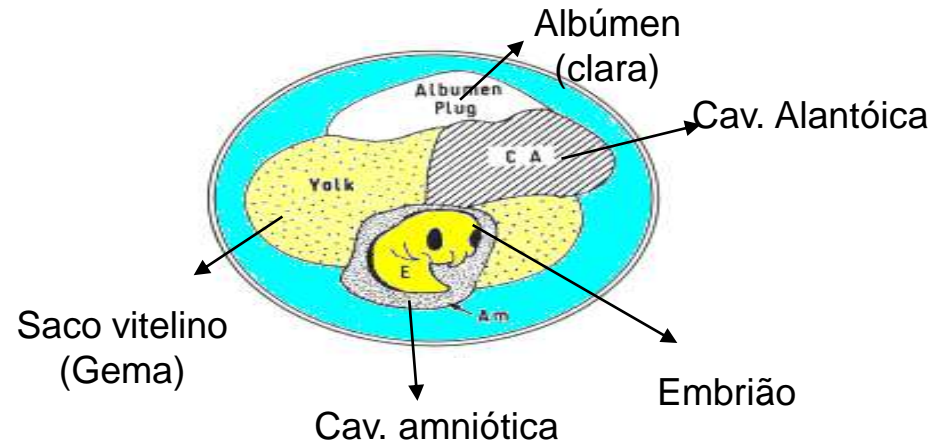
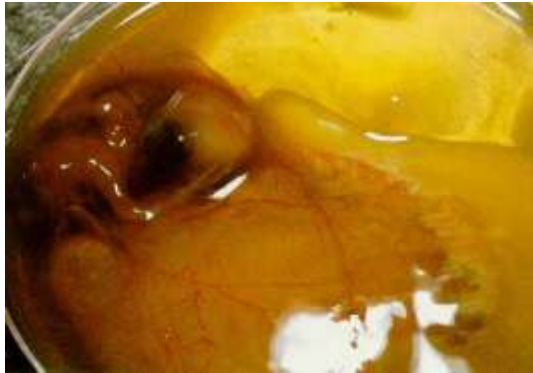


- Ovos embrionados

Ovos embrionados

- **Diagnóstico:** isolamento de alguns vírus a partir de amostra clínica

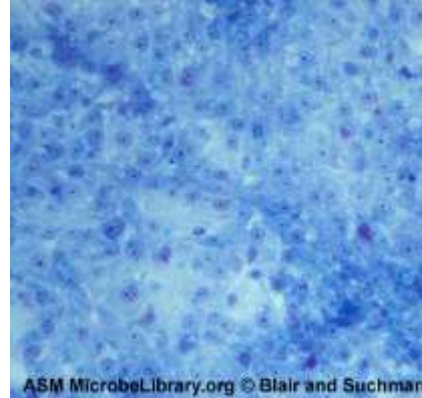
Ex: Febre Amarela, Influenza humano, Influenza aviário, Poxvírus



Cultura de células



É o termo utilizado para se referir às células quando estas estão sendo cultivadas *in vitro*.



ASM MicrobeLibrary.org © Blair and Suchman

Fonte: www.microbelibrary.org

Para isolamento de cada tipo de vírus devemos usar uma cultura de células específica



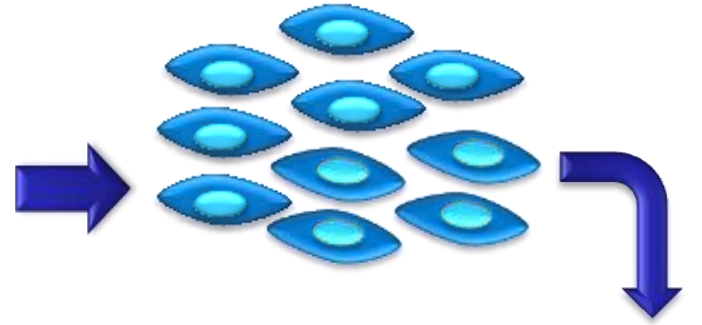
Obtenção dos cultivos celulares



Tecido



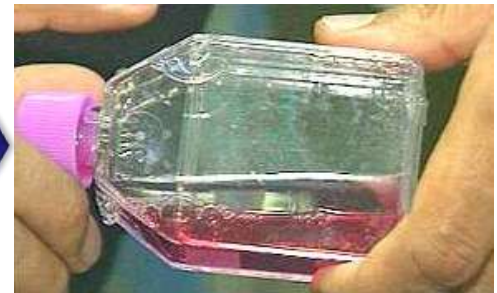
Tratamento
mecânico
e enzimático



Meio de cultura



Inoculação da amostra clínica:

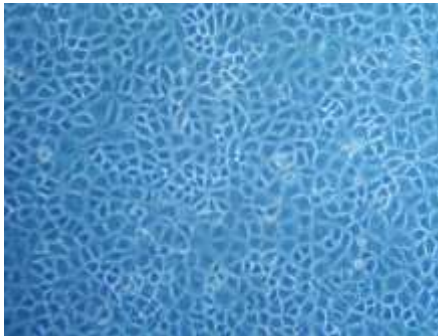


Cultivos celulares

Efeito citopático (ECP): alterações celulares que surgem em decorrência da infecção e replicação viral.

Vírus que causam ECP

Célula não infectada



Célula após infecção por vírus citopático



Vírus que não causam ECP

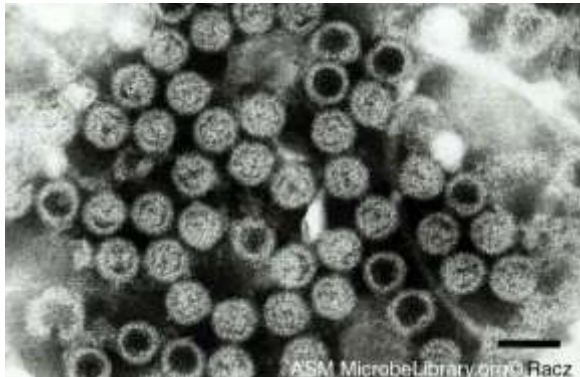


Identificação por outros métodos laboratoriais

Microscopia eletrônica

- Permite observar a morfologia do vírus
- Amostras para diagnóstico:
 - líquido vesicular: herpesvírus, poxvírus
 - material fecal: rotavírus

Rotavírus



Herpesvírus

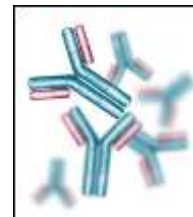


Métodos imunológicos

Permitem detectar antígenos virais (métodos diretos)

ou

Anticorpos (métodos indiretos/sorologia)



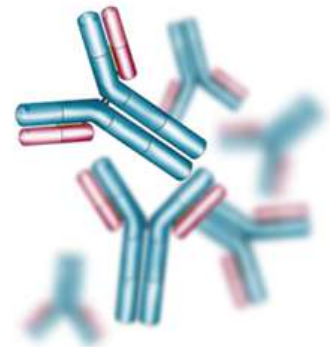
- Imunofluorescência direta (IFD) ou indireta (IFI)
- Elisa direto (ED) ou indireto (EI)
- Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)
- Radioimunoensaio (RIE)
- Testes imunocromatográficos
- Western-Blot (WB)

Métodos indiretos: SOROLOGIA

- **Utilização frequente para diagnóstico:**

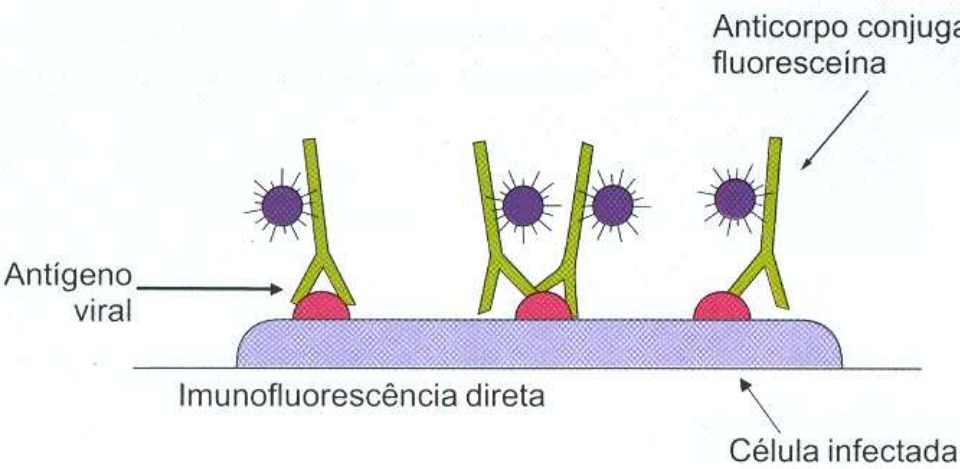
Existem alguns vírus que não podem ser isolados em sistemas hospedeiros e, muitas vezes, o isolamento viral é difícil e demorado.

- **Determinação de imunidade prévia (ex: resposta vacinal)**
- Identificar infecção ativa ou passada



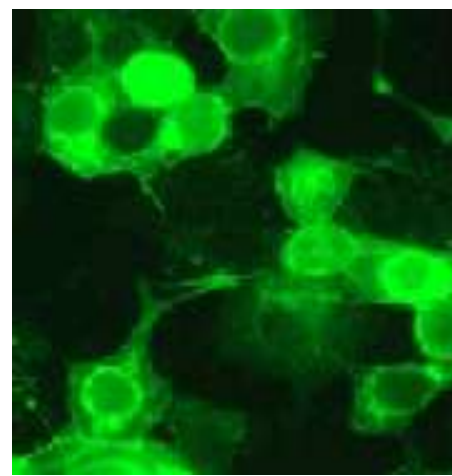
Imunofluorescência

Ex: Imunofluorescência direta para detecção de antígenos virais em célula infectada



Microscópio de fluorescência

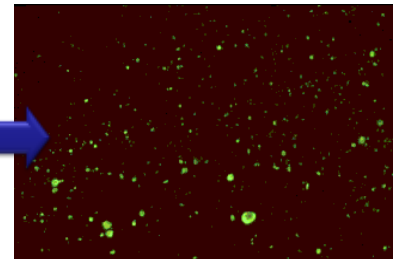
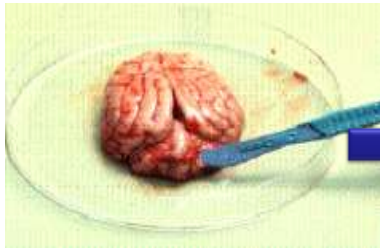
IFD positiva



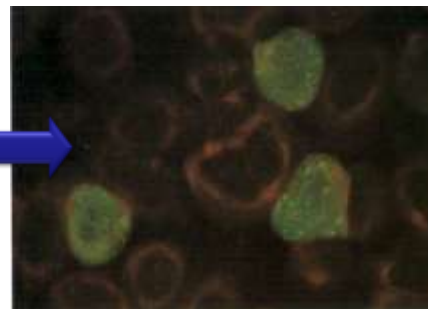
Imunofluorescência

Ex: Detecção de vírus da Raiva em tecido cerebral

Identificação de vírus Influenza em aspirado de nasofaringe



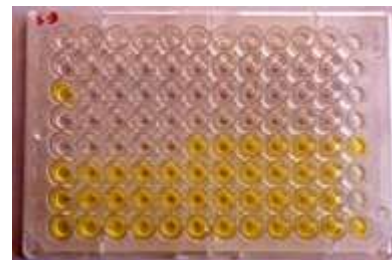
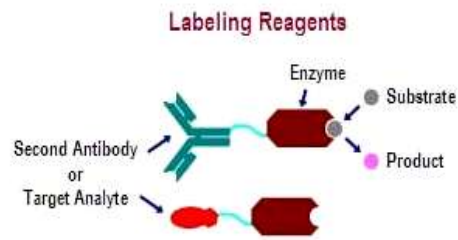
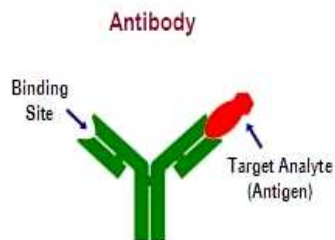
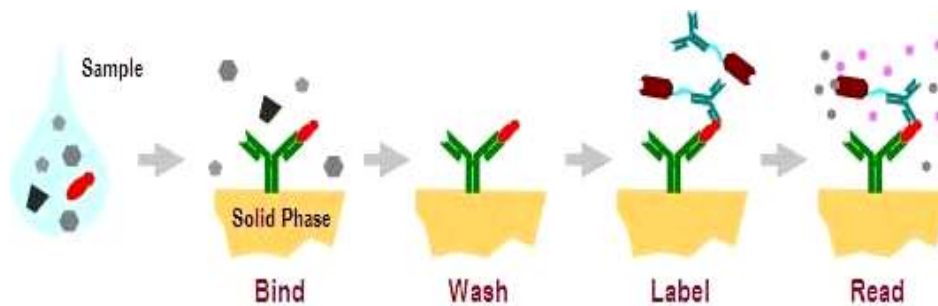
IFD positiva para
vírus da raiva



IFD positiva para
o vírus Influenza

Ensaio Imunoenzimático (ELISA ou EIA)

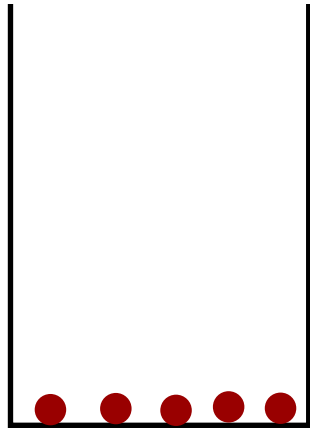
- Teste muito utilizado em laboratórios de diagnóstico.
- Pode ser feita para a identificação de antígenos ou anticorpos, e ainda permite a diferenciação de classe do anticorpo (IgM ou IgG).
- A escolha do kit a ser usado depende da suspeita clínica.



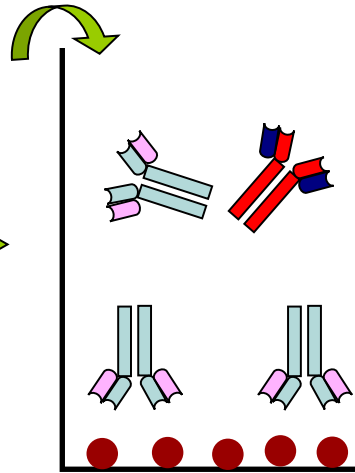
**Leitor de microplaca:
espectrofotômetro**

Elisa indireto para detecção de Acs

Placa sensibilizada

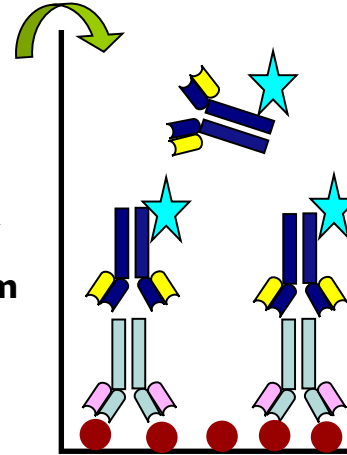


Amostra positiva



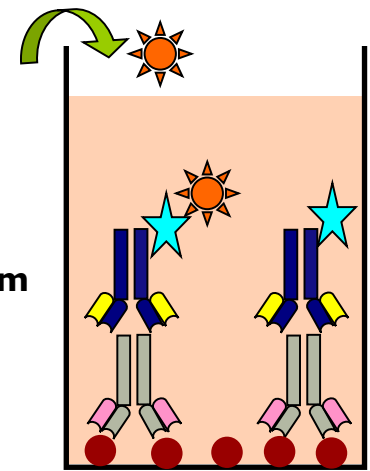
lavagem

Anticorpo marcado com enzima



lavagem

substrato



Leitor de microplaca:
espectrofotômetro



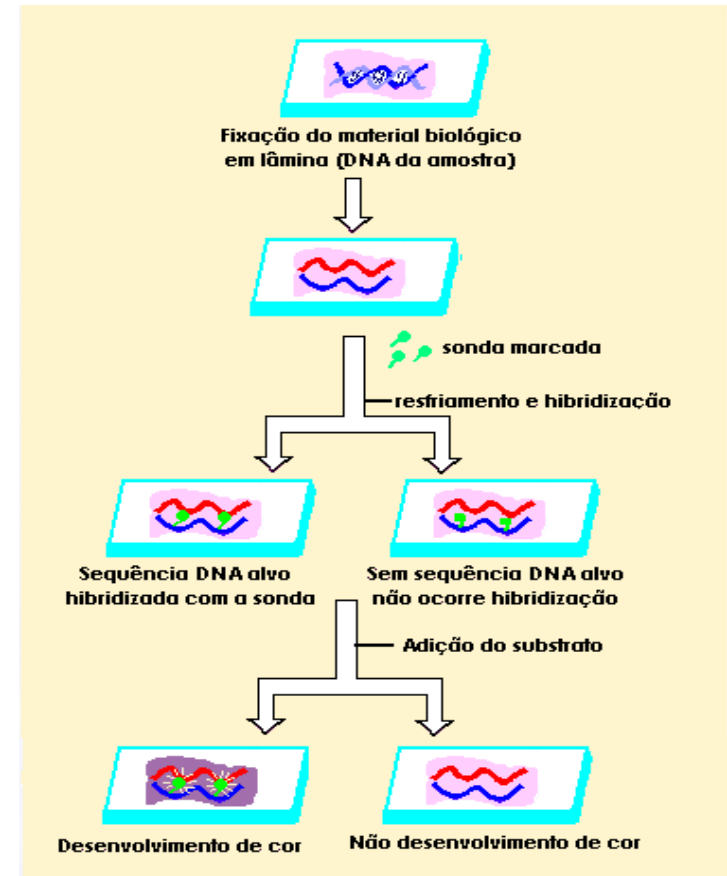
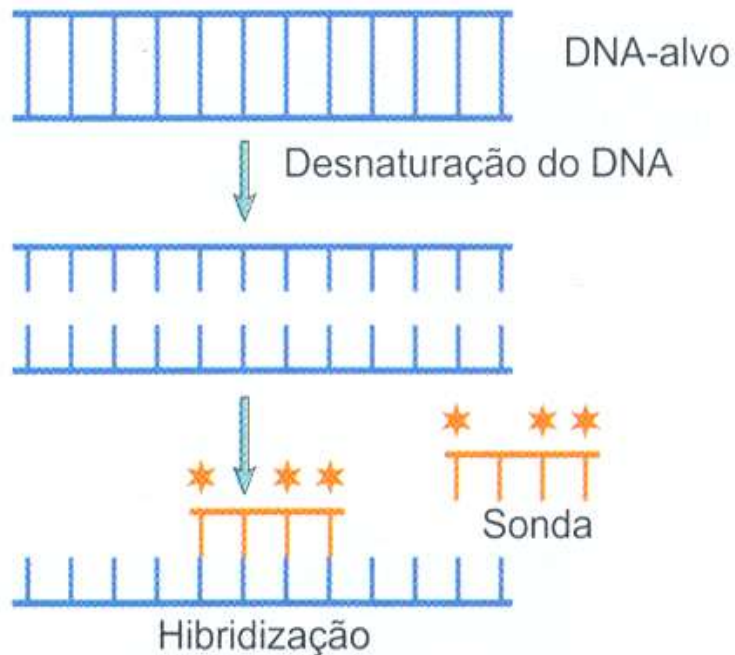
Diagnóstico Molecular

- **Princípio:** Todo ser vivo tem sequências de ácido nucléico que são específicas e podem ser detectadas por uma reação de hibridização ou de amplificação
- Técnicas que podem ser utilizadas: Reação em cadeia polimerase (PCR)
Hibridização *in situ*, Southern Blot, Captura Híbrida
- Estudo de vírus que não podem ser isolados em sistemas hospedeiros (Ex: Papilomavírus, Rotavírus)

Hibridização *in situ*

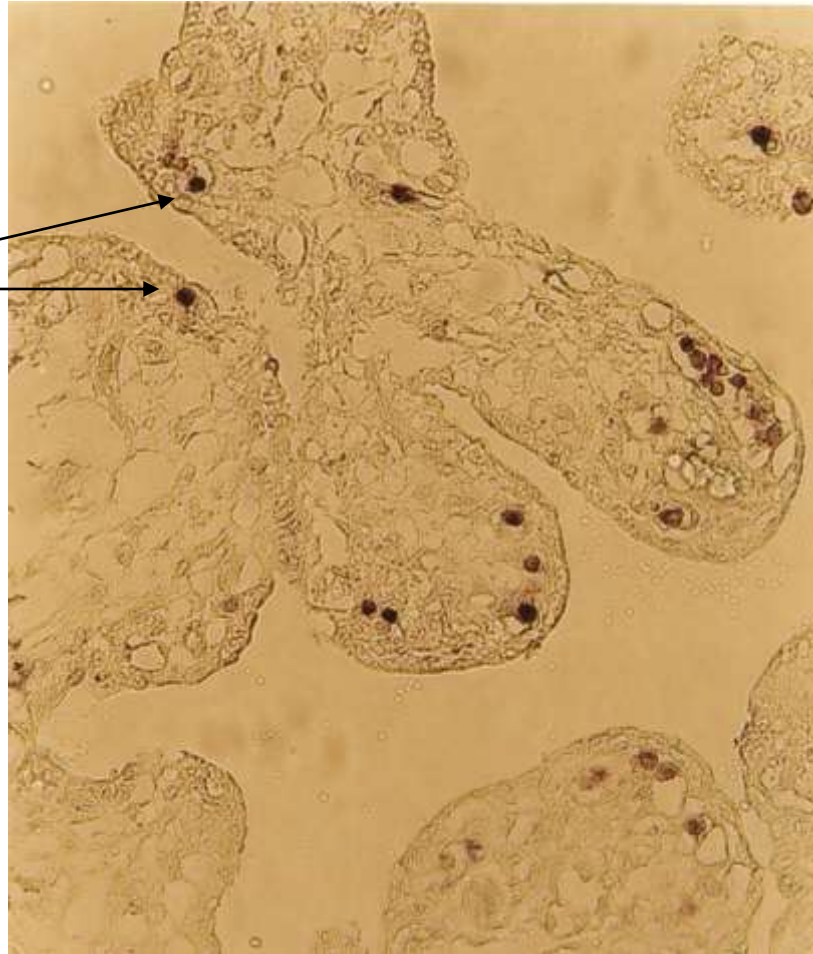
- Feita em cultivos celulares, cortes de tecidos ou esfregaços
- Hibridização do genoma viral com sondas complementares marcadas com enzimas.

HIBRIDIZAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO



Hibridização *in situ* Para detecção de HPV em esfregaço cervical

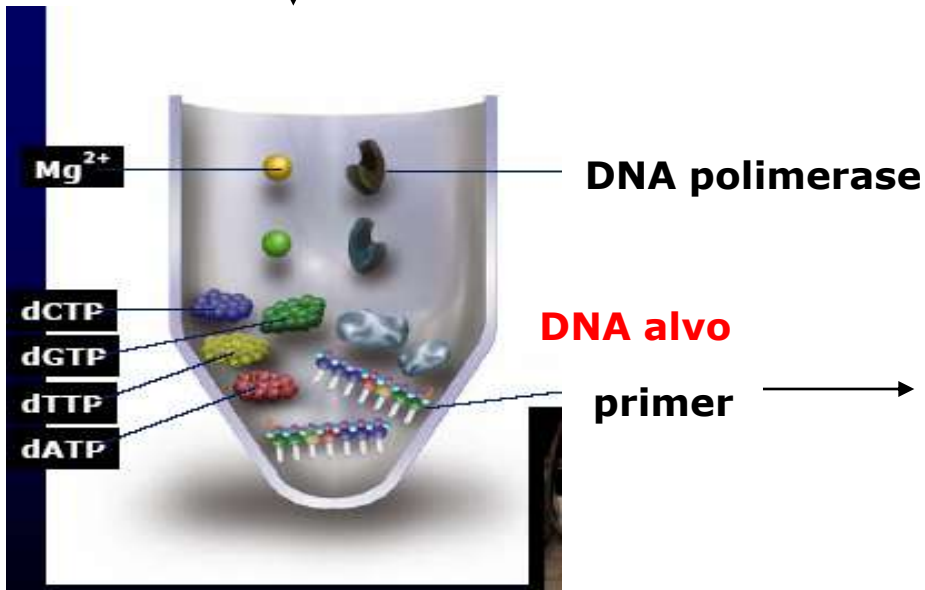
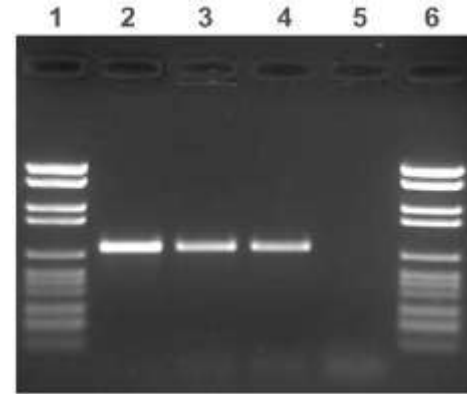
Locais onde
ocorreu Hibridização



Detecção de ácido nucléico viral (PCR)



Extração DNA/RNA



Fundamentos da técnica

- Detecção e amplificação de um fragmento específico de DNA catalisada pela DNA-polimerase a partir de primers ou iniciadores.
- Os primers são seq. de nucleotídeos e devem ser desenhados de acordo com a sequência a ser amplificada (target)

Isolamento do Genoma



Retira-se uma alíquota da amostras clínica

O patógeno é lisado

O genoma é extraído e resuspendido

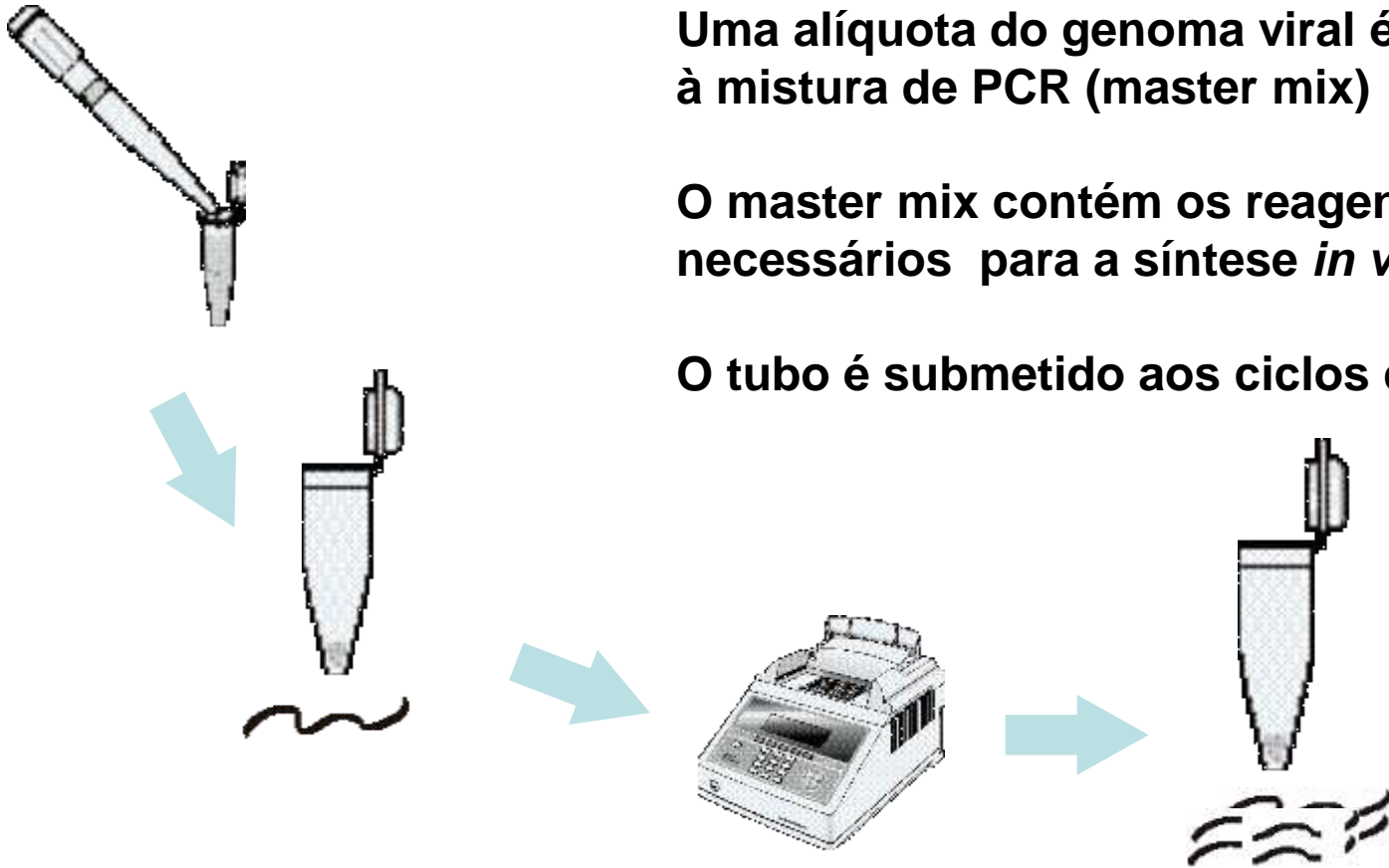
**Kits de extração de RNA e DNA estão disponíveis
No mercado**

O PCR

Uma alíquota do genoma viral é adicionada à mistura de PCR (master mix)

O master mix contém os reagentes necessários para a síntese *in vitro* do DNA

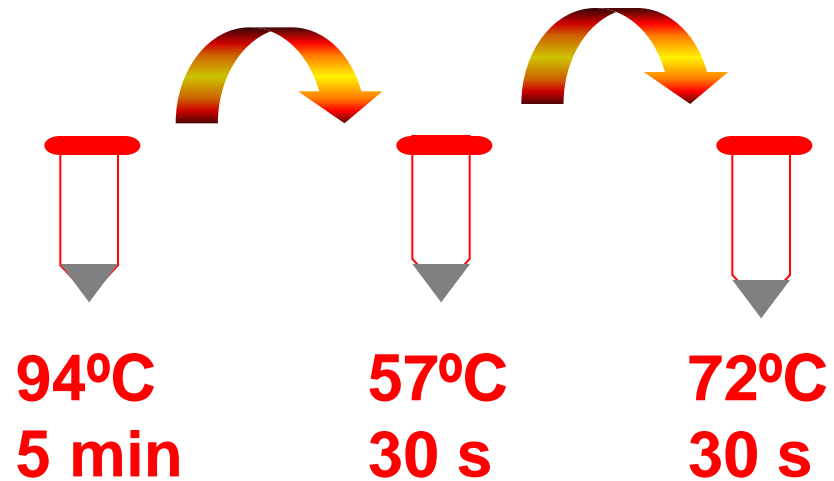
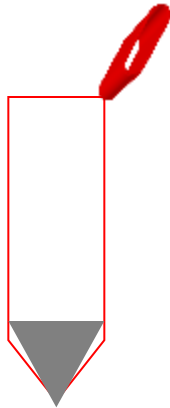
O tubo é submetido aos ciclos do PCR



Reação em cadeia da Polimerase PCR

DNA genômico
Taq polimerase
Primers
Tampão

dCTP
dATP
dGTP
dTTP



PCR- CICLOS

A amostra clínica deve ser submetida a 25-40 ciclos repetitivos de:

➤ **Desnaturação (abertura da dupla fita)**

Aquecimento por cerca de 95°C.

➤ **Anelamento**

Temperaturas entre 40-70°C (média de 55°C)

➤ **Extensão**

Taq DNA polimerase atinge sua temperatura ótima a 72°C.

PCR

Taq DNA pol.

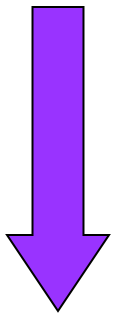
A T C G

5' AACGTTTCGATGCAAATGC
3' TTGCAAGCTACGTTTACG

+ AACG
Primer
senso

TAGC
Primer anti-
senso

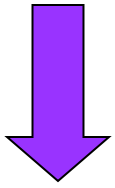
95°C 5min



AACGTTTCGATGCAAATCG
TAGC AACG

TTGCAAGCTACGTTTACG

42°C 20 seg.



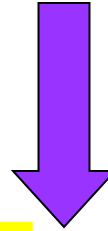
AACGTTTCGATGCAAATCG
TAGC

AACG
TTGCAAGCTACGTTTACG

PCR

AACGTTTCGATGCAAATCG
TAGC

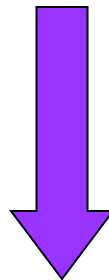
AACG
TTGCAAGCTACGTTAACG



72°C 20 seg.

AACGTTTCGATGCAAATCG
TTGCAAGCTACGTTTAGC

AACGTTTCGATGCAAATTGC
TTGCAAGCTACGTTAACG



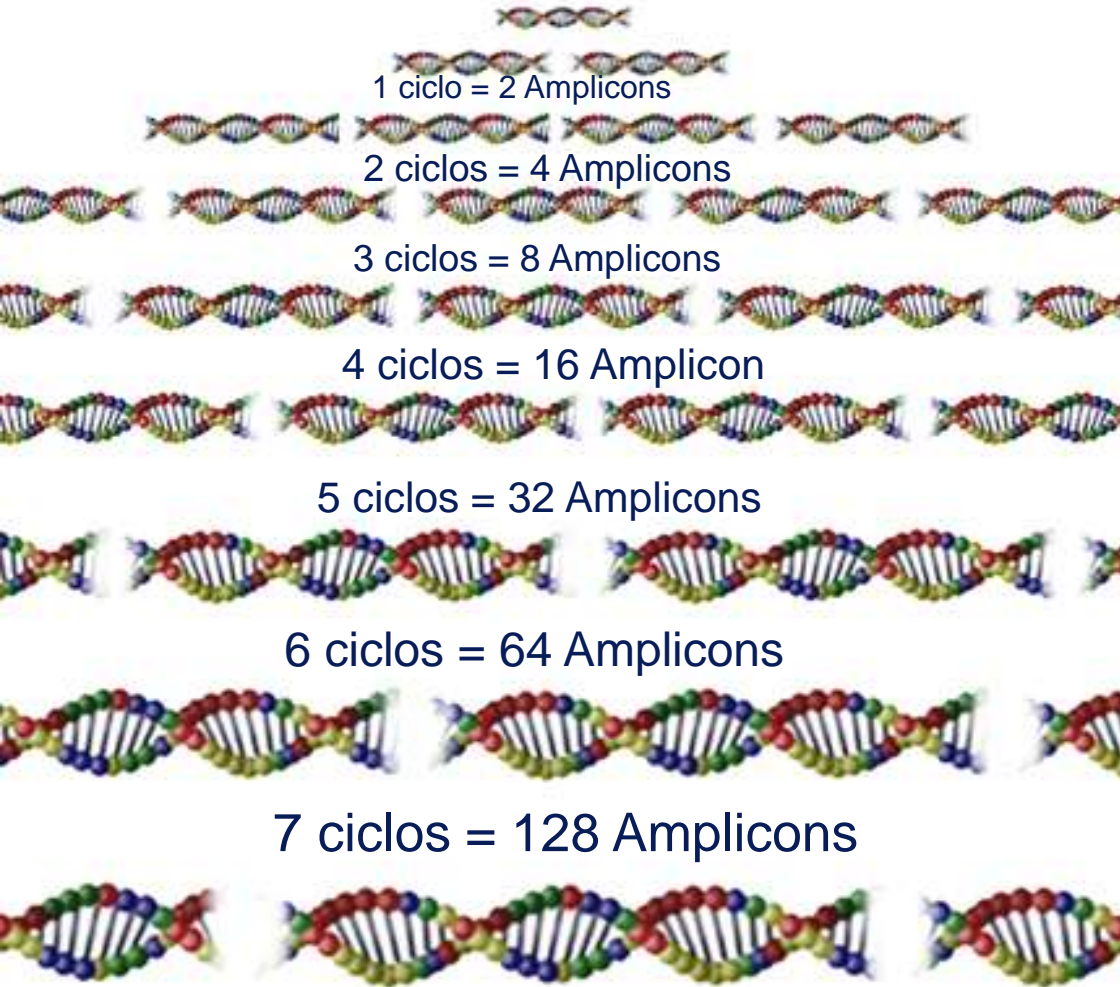
95°C 30 seg.

42°C 20 seg.

72°C 60 seg.

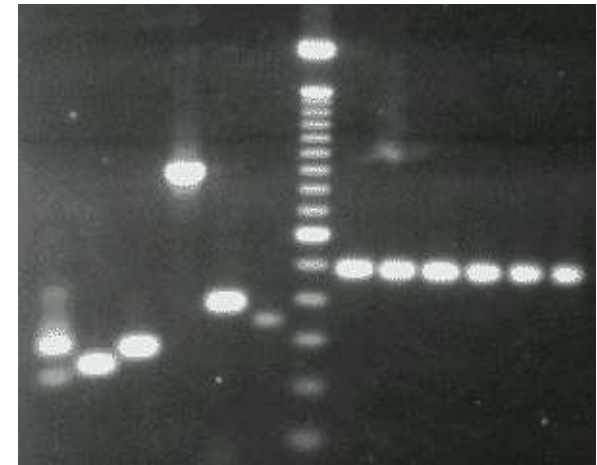


METODOLOGIA DA PCR

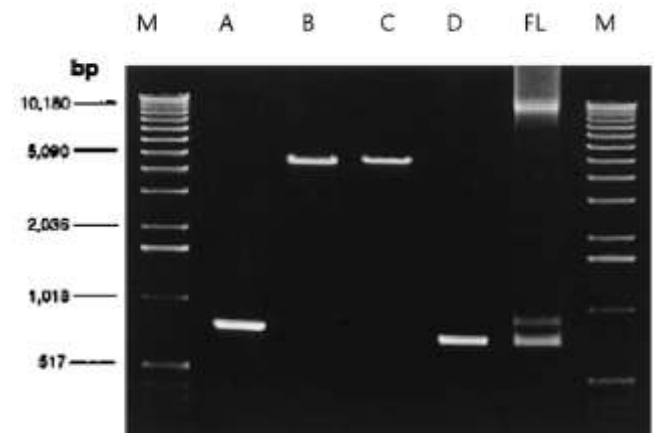


Ciclos	Amplicons
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

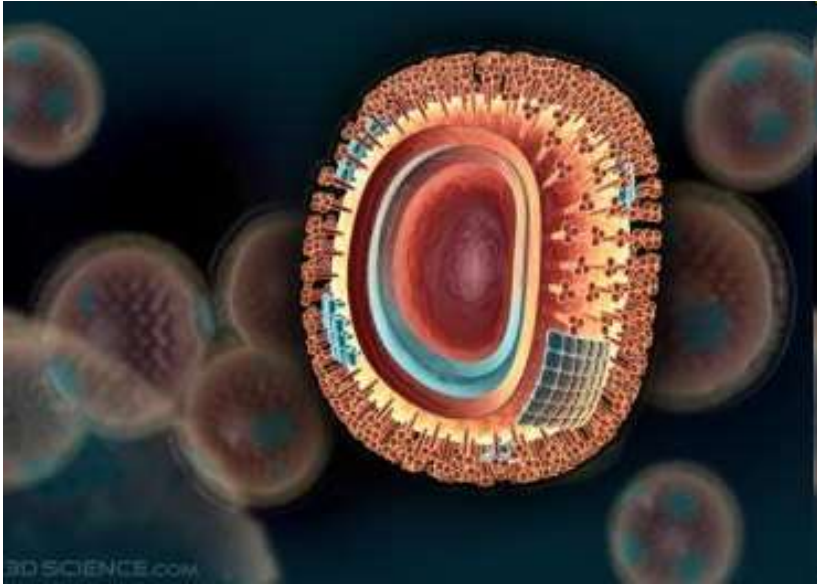
- O fragmento gerado após este processo chama-se AMPLICOM



- Usualmente o amplicom pode ser visualizado através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo, iluminado por luz U.V.

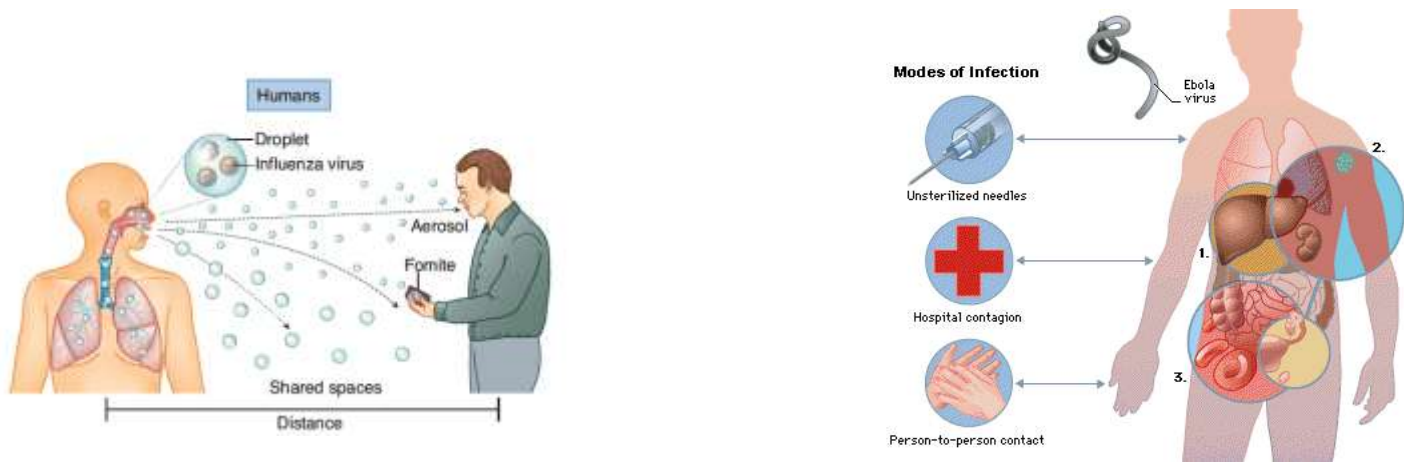


Prevenção e controle das viroses



Prevenção e controle das viroses

Cadeia do processo infeccioso



Identificação de pontos frágeis que sejam passíveis de intervenção, visando ao controle e prevenção das doenças.

Identificação das formas de **transmissão**

Estratégias de prevenção e controle das viroses

- **Quarentena e isolamento**
- **Medidas higiênicas e sanitárias (Hepatite A, Rotavírus, SARS)**
- **Controle de vetores (Dengue, febre amarela e raiva)**
- **Mudança de comportamento (HIV, HBV e HPV)**
- **Vacinação (Rubéola, Sarampo, Varíola)**



Quarentena

- Isolamento físico de pessoas com suspeita de infecção.
- Febre Amarela: 1ª infecção viral onde tentou-se utilizar a quarentena como forma de prevenção.
- Controle de viroses sem infecções subclínicas e quando não há eliminação viral antes dos sintomas.

"O Rio apresentava focos permanentes de difteria, malária, tuberculose, lepra, tifo, mas suas ameaças mais aflitivas eram a varíola e a febre amarela, que todo verão se espalhavam pela cidade como uma maldição. Por isso a cidade tinha, desde o século XIX, a indesejável reputação de 'túmulo do estrangeiro'."

Febre amarela no Brasil



Fonte: www.almanaquedacomunicacao.com.br

Campanhas de Oswaldo Cruz (1903)



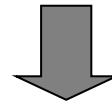
Fonte: www.almanaquedacomunicacao.com.br

Quarentena

SARS (Síndrome Respiratória Aguda Severa): 10 dias após a resolução da febre



Sinais sistêmicos



Sinais respiratórios



Ebola

- auto-observação por 21 dias (CDC)
- fim da transmissão: 42 dias (2 X período de incubação do vírus) + 90 dias de vigilância intensa

Phase 3

3 objectives

- To interrupt all remaining chains of Ebola transmission.
- To respond to the consequences of residual risks.
- To work on health systems recovery.

CDC Rejects Mandatory Ebola Quarantines

Federal Officials Push for Voluntary Isolation of Those at High Risk



Sierra Leone village in quarantine after Ebola death

© 4 September 2015 | Africa



The last quarantined village was reopened by Sierra Leone's president in August

Isolamento

Pessoas ou animais sabidamente infectados

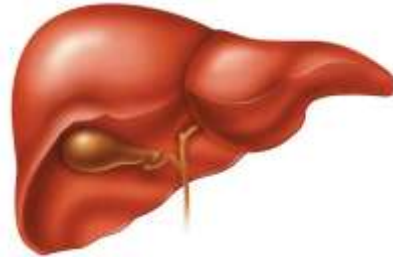
O isolamento permite o cuidado especializado para pessoas que estão doentes, e protege as pessoas saudáveis de ficarem doente.

Pode ser compulsório ou sugerido



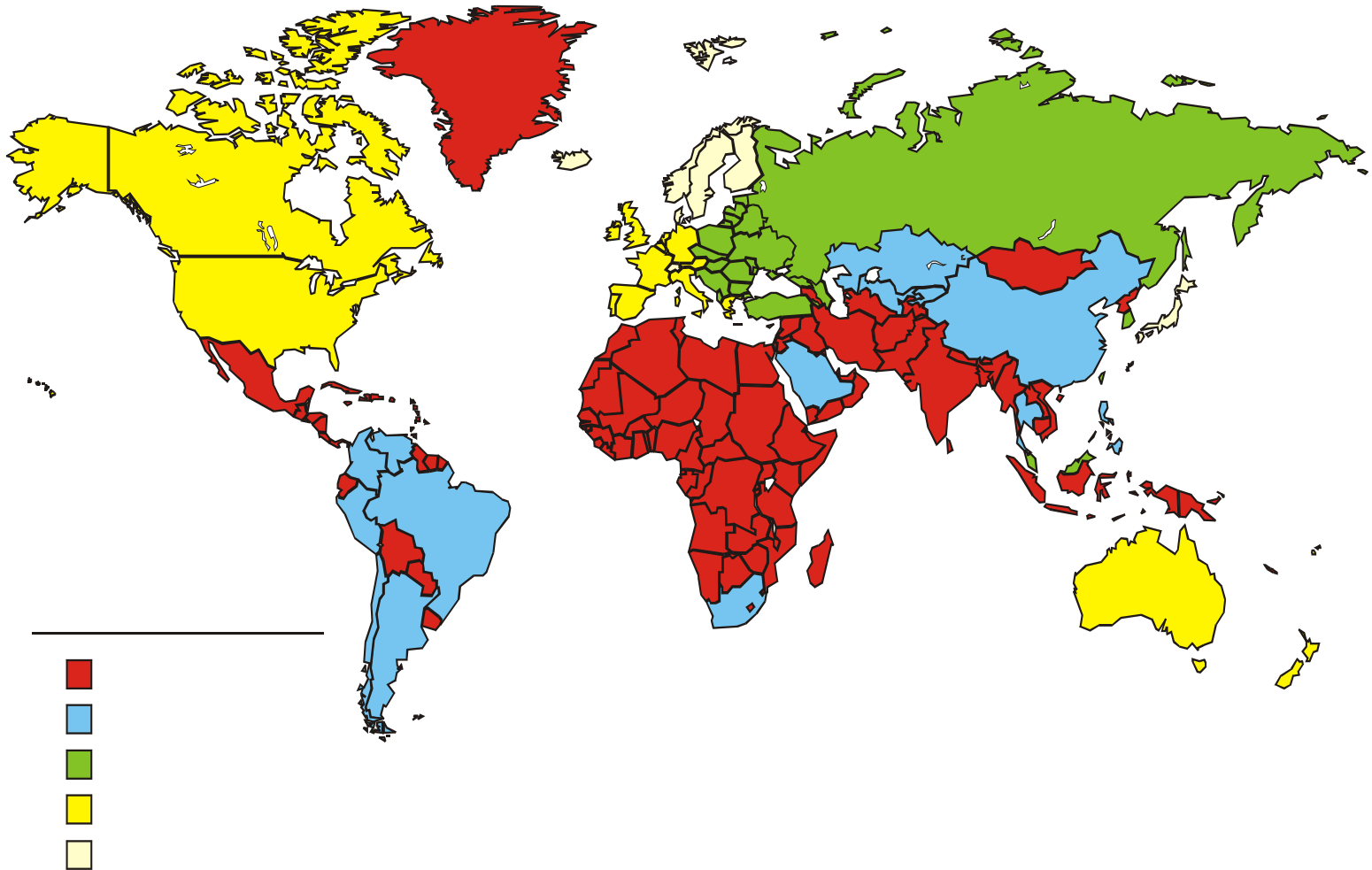
Mudanças no estilo de vida

Ex: HIV, HBV, HPV, HCV



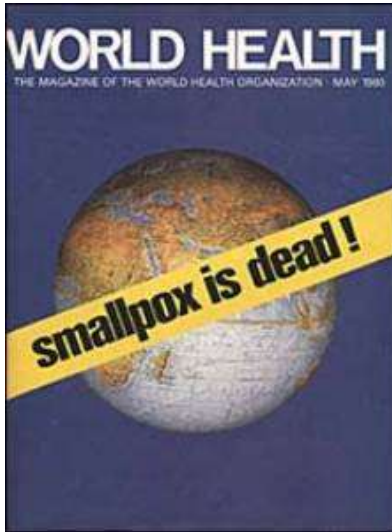
Medidas higiênicas e sanitárias

Ex: Hepatite A



Vacinação

Principal forma de controlar e erradicar uma doença!!!

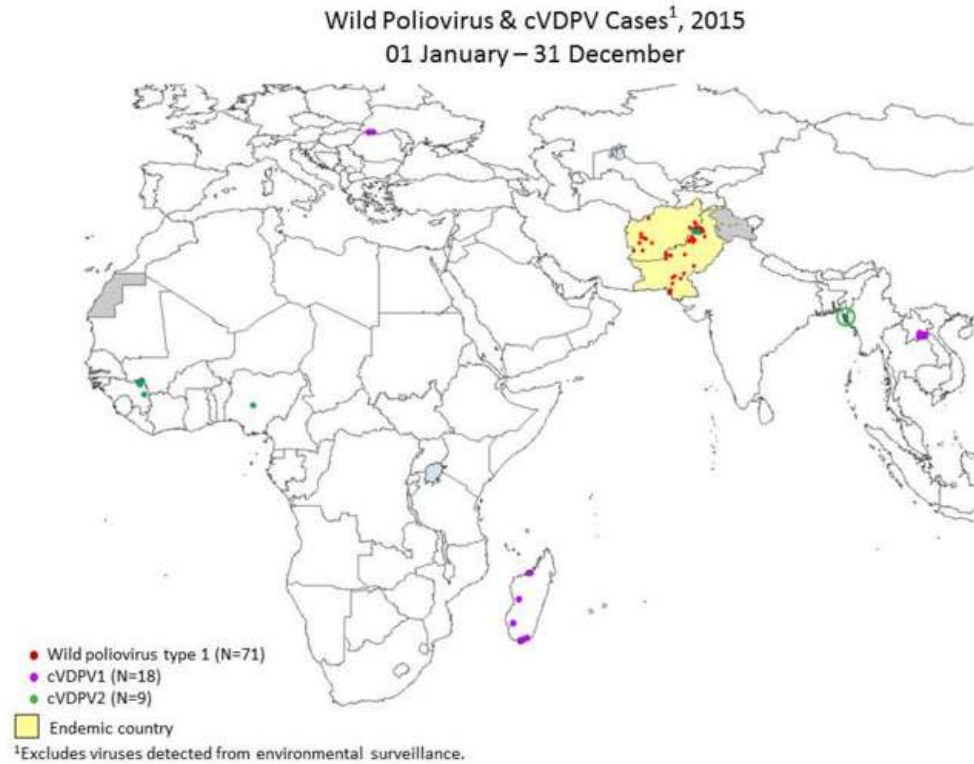


Fonte: www.unostamp.nl



Fonte: www.svs.gov.br

Polio cases in the world in 2015



Data in WHO HQ as of 12 January 2015

BRASIL Serviços Participe Acesso & Informar

portal da saúde

Cidade: Profissional e Gestor | O Ministério | Serviços | Biblioteca | Acesso à Informação

Principais | Acesso à Informação | Licitações e Contratos

Cidade: Agência Saúde

Palavra-Chave Tema Escolha mês Escolha ano Buscar

Data de Cadastro: 26/07/2016 às 09:07:59 alterado em 26/07/2016 às 14:07:13

VIGILÂNCIA

Eliminação do sarampo no Brasil tem reconhecimento internacional

Até o final de 2016 o Brasil recebeu, da OMS, o certificado de eliminação do sarampo – e com isso ficou reconhecido a fim da transmissão da doença em todo o continente americano.

O sarampo está eliminado no Brasil. O anúncio foi feito durante visita ao Brasil da presidente do Comitê Internacional de Especialistas de Avaliação e Documentação da Sustentabilidade do Sarampo nas Américas (CIE), Mercedes Del-Riego: o último caso relatado no país foi no Ceará, em julho de 2015. A expectativa agora é que, até o final de 2016, o Brasil reciba o certificado de eliminação do sarampo pela Organização Mundial de Saúde (OMS) – e com isso ficará reconhecida a eliminação da transmissão da doença em todo o continente americano, que será a primeira região do mundo onde isso acontecerá. O mesmo ocorreu, em 2015, com a rubéola e a síndrome da rubéola congênita.

Surto de caxumba é o maior desde 2008

Falta de vacinação das duas doses necessárias para a imunização é um dos motivos do aumento dos casos

FACEBOOK TWITTER GOOGLE+ PAGINA INICIAL ALTO CONTRASTE

ESTADÃO conteúdo



Para se prevenir contra a caxumba, é preciso tomar duas doses da vacina
Marcelo Camargo / Agência Brasil

Fale conosco Ouvidoria English Español Intranet

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz: uma instituição a serviço da vida

Buscar na Fiocruz

A FUNDAÇÃO PESQUISA E ENSINO PRODUÇÃO E INOVAÇÃO SERVIÇOS SAÚDE

Você está aqui: Início > Comunicação e Informação > Notícias > Rubéola: Brasil recebeu da OMS o Certificado de Eliminação da doença

04/12/2015

Rubéola: Brasil recebeu da OMS o Certificado de Eliminação da doença

Por: Maira Menezes (IOC/Fiocruz)

A rubéola e a síndrome da rubéola congênita estão oficialmente eliminadas no Brasil e nos demais países das Américas. Nesta quarta-feira, 2/12, o Ministério da Saúde (MS) brasileiro recebeu o Certificado de Eliminação da doença da Organização Mundial da Saúde (OMS) em uma cerimônia realizada em Brasília. Os últimos casos de transmissão da rubéola e da síndrome da rubéola congênita no país ocorreram em 2008 e 2009, respectivamente. "A eliminação dessas doenças nos deixa muito felizes. A rubéola costuma ser uma infecção branda, mas, quando acomete grávidas, os bebês podem desenvolver a síndrome da rubéola congênita, que pode causar malformações cardíacas e catarata", afirmou a virologista Marilda Siqueira, chefe do Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Ela é membro do Comitê Internacional de Especialistas para Eliminação do Sarampo e Rubéola nas Américas.

SAÚDE

Saiba como será a vacinação contra a febre amarela em apenas uma dose

Prevenção

Devem ser vacinadas apenas as pessoas que vivem ou viajam para as áreas de recomendação da vacina

Publicado: 09/04/2017 09:07
Última modificação: 12/04/2017 17:00

Copiar

Twitter

G+1

Divulgação/Governo de São Paulo



Estratégia de vacinação adotada pelo Brasil é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

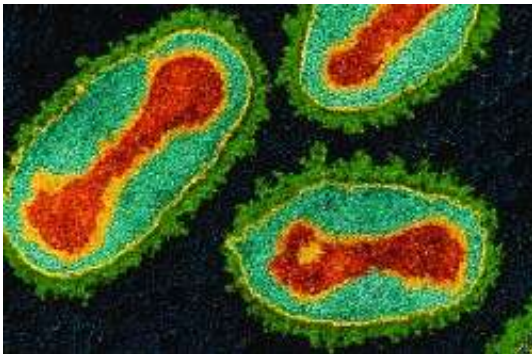
A partir deste mês de abril, crianças com nove meses e adultos até 59 anos precisam tomar apenas uma dose da vacina contra a doença. Com a medida, crianças e adultos, que já tomaram uma dose, não precisam se vacinar mais contra a doença ao longo da vida. A medida já era adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 2014.

HISTÓRICO

Século XI: Variolação originada na China se difunde para o Ocidente e é aprimorada.

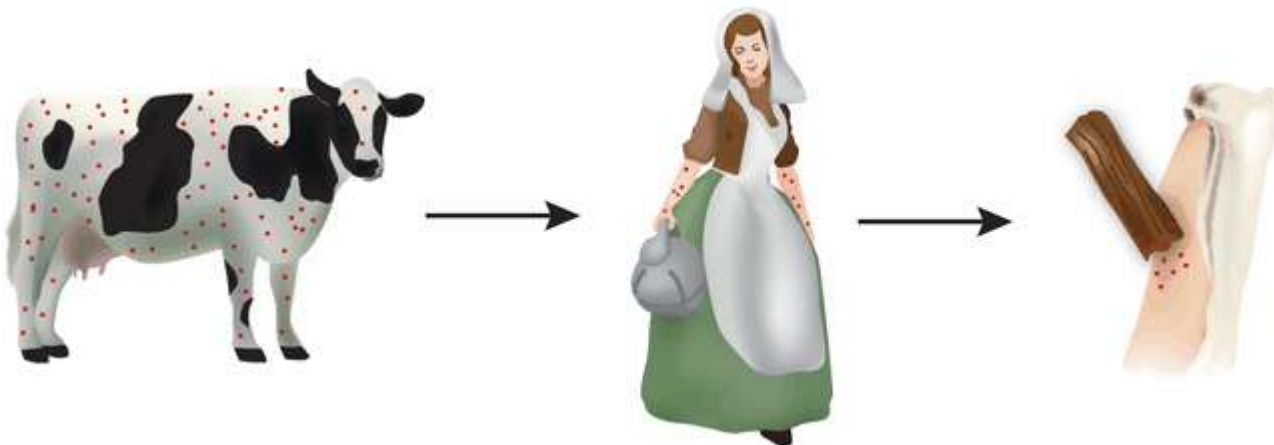


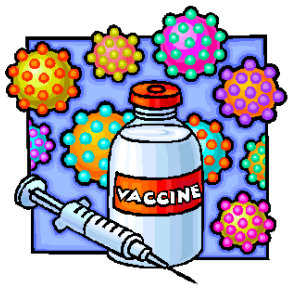
Poxvírus



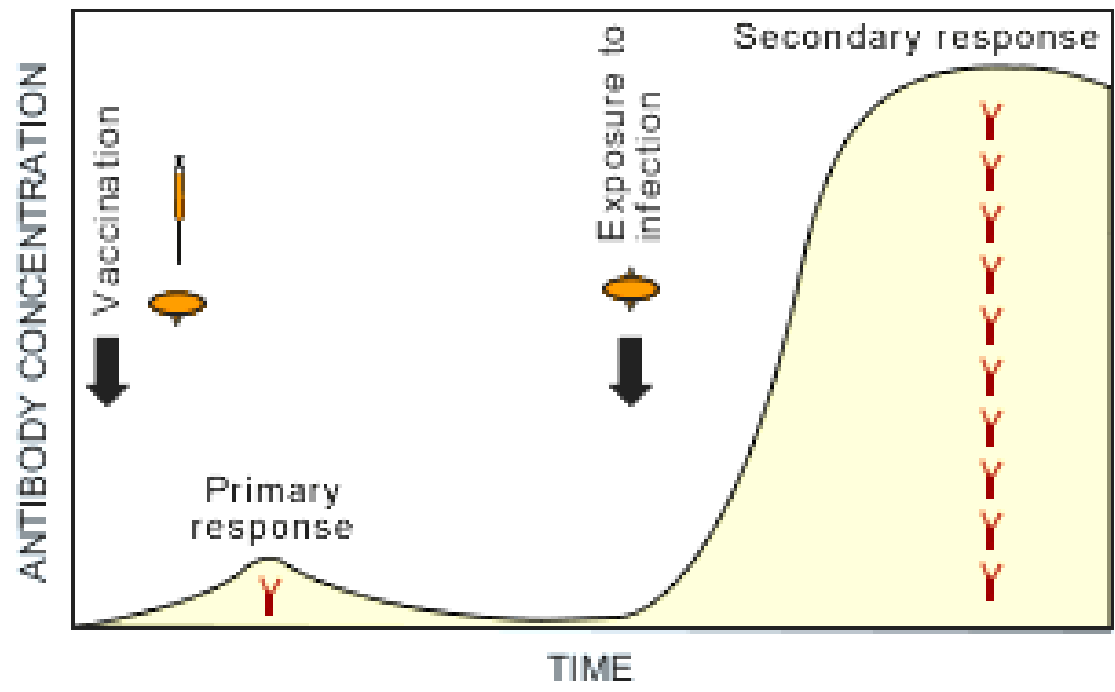
HISTÓRICO

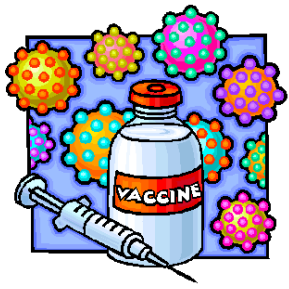
1798: Edward Jenner inoculou material das mãos de ordenhadoras (Cowpox) e desafiou uma criança com varíola (Smallpox)





Vacinação





O QUE ESPERAR DE UMA VACINA?

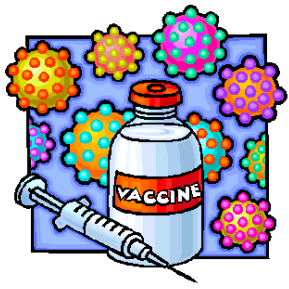
- Imunidade prolongada

Desenvolvimento de resposta imune celular e humoral

- Segurança
- Efeitos colaterais mínimos
- Estabilidade
- Fácil produção e baixo custo

Efeitos colaterais graves

- **Reação alérgica grave (anafilática)**
 - ocorre em aproximadamente 1 em cada 131.000 doses aplicadas.
- **Reações no sistema nervoso central (encefalite)**
 - cerca de 1 caso para cada 150.000 - 250.000 doses.
- **Comprometimento de múltiplos órgãos com o vírus vacinal da febre amarela**
 - aproximadamente 1 caso para cada 200.000 - 300.000 doses.
 - acima de 60 anos cerca de 1 caso para cada 40.000 - 50.000 doses).
 - mais da metade dos indivíduos com *febre amarela* vacinal evoluem para o óbito.



Tipos de vacinas virais

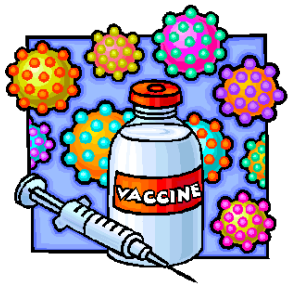
- Vacinas atenuadas (MMRV; FA; VOP, Rota)
- Vacinas inativadas
 - Vírus completo (VIP)
 - Vacinas de subunidades (FluV)
 - Vacinas recombinantes (HBV)
 - *Virus like particles* (VLP) (HPV)
 - Vacinas de DNA

Mudanças no calendário vacinal 2016/2017

- HBV: irrestrito
- HAV: 9 meses de idade
- HPV: 2 doses e não mais 3 (até 14 anos e não mais de 9 a 13 anos)
- POV: VIP como vacina principal (3 doses).
VOP como reforço

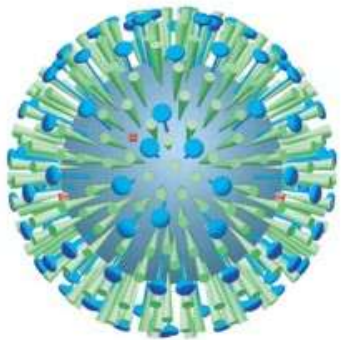
Seis vacinas terão seu público-alvo **ampliado** em 2017

- **Hepatite A:** crianças (aos 15 meses)
- **Tetra Viral** (sarampo, rubéola, caxumba e varicela): crianças
- **Meningocócica C:** crianças e adolescentes
- **dTpa** (difteria, coqueluche e tétano): gestantes
- **Tríplice viral** (sarampo, rubéola e caxumba): adultos
- **HPV:** meninos, pessoas vivendo com HIV/aids e imunossuprimidos (pessoas transplantadas)



VACINAS ATENUADAS

- Contém o vírus atenuado, derivado do vírus selvagem
- Atenuação: perda da **virulência** sem perda da **infectividade**

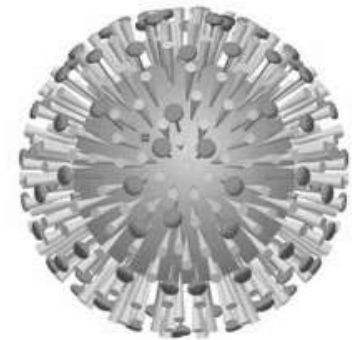
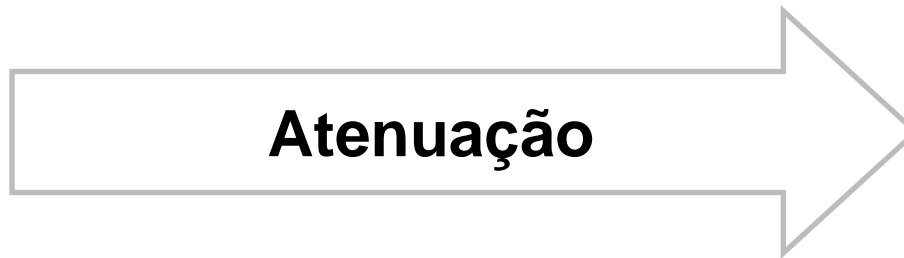


Vírus selvagem

VIRULENTO

E

IMUNOGÊNICO



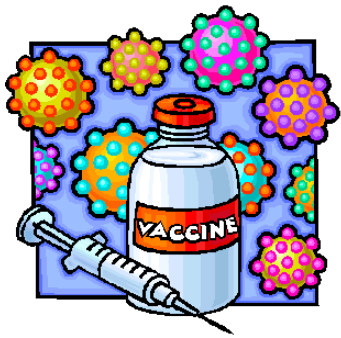
Vírus atenuado



NÃO VIRULENTO

E

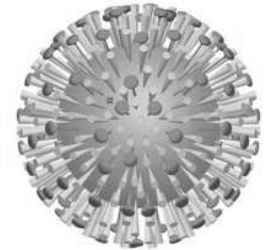
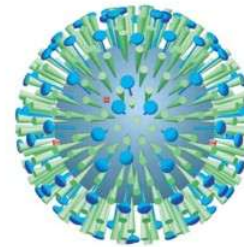
IMUNOGÊNICO

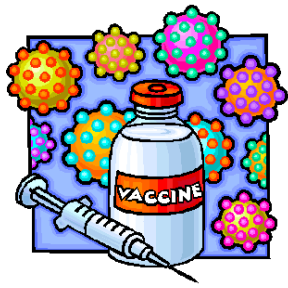


VACINAS ATENUADAS

Desvantagens

- Lábil: rede de frio
- Reversão à virulência
- Não pode ser aplicada em grávidas e imunocomprometidos
- *Reassortment* com vírus selvagens

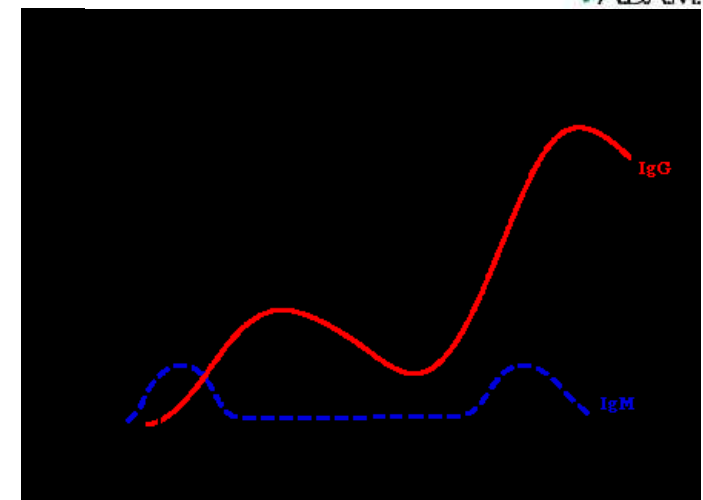
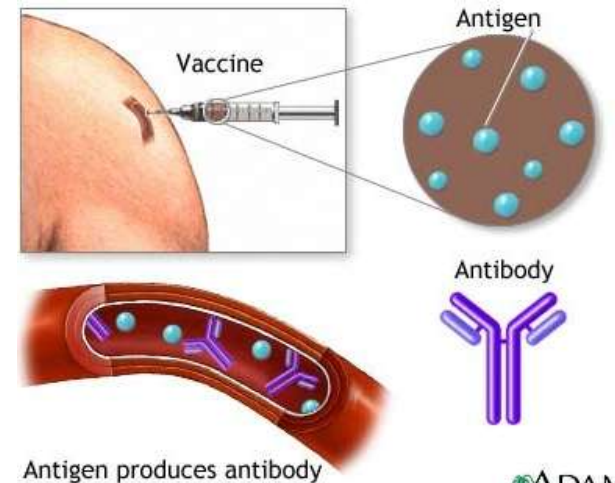




VACINAS INATIVADAS

Vírus inativado: agentes químicos ou físicos para **destruir a infectividade, mas não a imunogenicidade.**

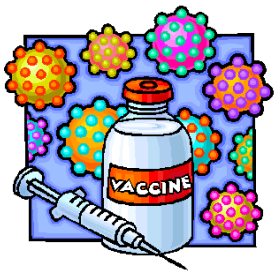
- Administração por via intramuscular
- Vírus inativados não são muito imunogênicos
- Necessidade de adjuvantes e doses de reforço





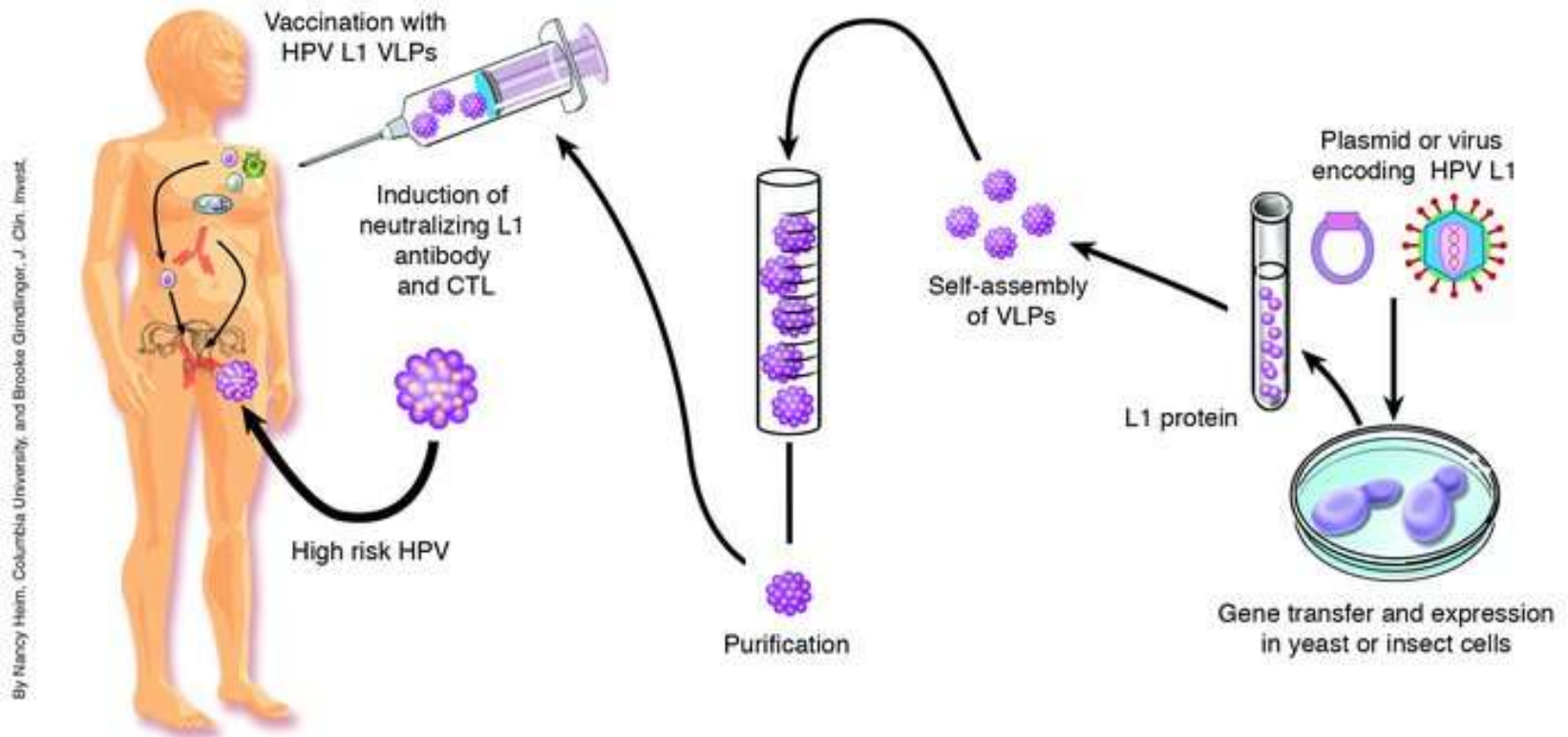
VACINAS DE SUBUNIDADES

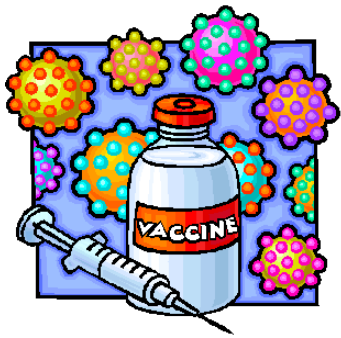
- Proteínas/Peptídeos virais purificados ou sintéticos
- Vantagens: segurança, podem ser usadas para vírus não cultiváveis
- Desvantagens: alto custo, dificuldade de produção.



Vacinas de subunidades

- Papilomavirus (HPV): Virus Like Particles (proteína L1 do HPV)
 - Produzido em leveduras (*S. cerevisiae*) ou células de inseto (Baculovírus)





Falhas vacinais:

Fatores do Hospedeiro:

- Desnutrição
- Infecção concorrente
- Terapia com drogas imunossupressoras
- Stress
- Idade



Fatores da Vacina: Conservação (manter a “rede de frio”)