

# **Métodos de Diagnóstico Viroológico**

**Tatiana Castro**  
**Departamento de Microbiologia e**  
**Parasitologia**  
**Instituto Biomédico**  
**Universidade Federal Fluminense**

# Diagnóstico laboratorial das viroses

---

## Por que e quando solicitar o exame laboratorial de uma virose?

➤ **Auxílio no diagnóstico clínico:** determinação do agente causal em casos de diarreia, inf. respiratórias, etc.

➤ Para iniciar **tratamento específico**, quando possível.

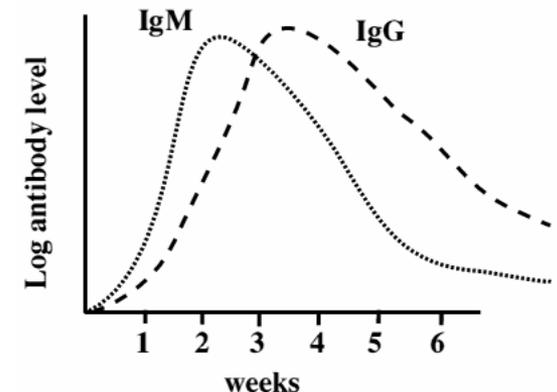
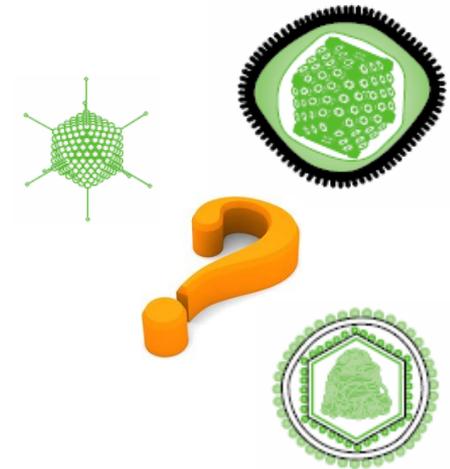
Zoonoses: p. ex. raiva  $\Rightarrow$  confirmação do diagnóstico fornece a base para tratamento pós-exposição.

➤ **Doenças virais erradicadas**  $\Rightarrow$  diagnóstico clínico de um caso suspeito deve ser confirmado em laboratório.

➤ **Vigilância epidemiológica:** estudos de prevalência de uma determinada virose.

# Importância do diagnóstico Viroológico

- Diferenciação da fase da doença
- Pesquisa epidemiológica
- Triagem de sangue e órgãos
- Avaliação de imunidade pós-vacinação



# Amostras clínicas



Suspeita clínica



# Amostra Clínica

---

Infecção respiratória: **aspirado de nasofaringe, swab de garganta**

Infecção entérica: **Fezes**

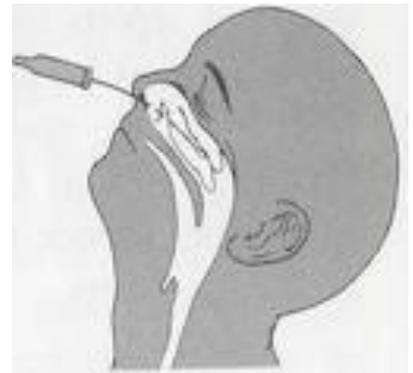
Pele: **líquido da vesícula, biópsia**

Urina

Infecção no SNC: **líquor, cérebro**

Sangue ⇒ **soro**

Morte: **qualquer tecido**



**Todo material deve ser acompanhado de uma ficha clínica com dados e histórico do paciente**

# MÉTODOS DIRETOS (Detecção do vírus)

---

## Métodos clássicos:

**Isolamento do vírus:** Cultura de células  
Ovos embrionados  
Animais



## Métodos rápidos:

**Observação da partícula viral:** Microscopia eletrônica

**Detecção do antígeno viral:** Imunofluorescência (IF)  
Ensaio imunoenzimático (EIE)

**Detecção do genoma viral:** Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

# MÉTODOS INDIRETOS (Detecção de anticorpos)

---

**Imunofluorescência (IF)**

**Ensaio imunoenzimático (EIE)**

# Métodos Clássicos de Diagnóstico Viroológico (Métodos clássicos)

---

- Animais de Laboratório



- Cultura da células



- Ovos embrionados

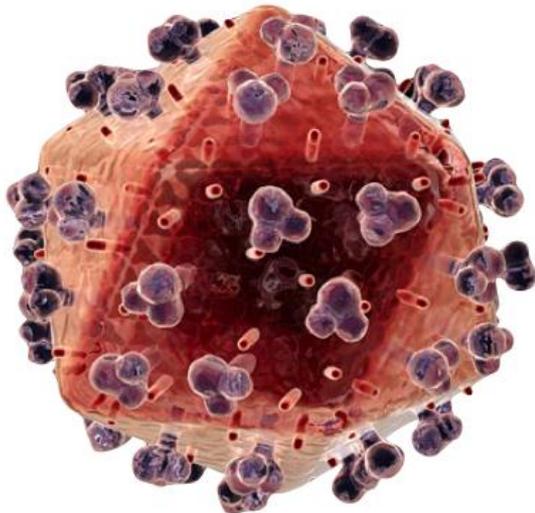


## Animais de laboratório

---

- Atualmente uso muito restrito
  - Diagnóstico de raiva em camundongos lactentes
  - Isolamento e multiplicação de vírus que não replicam bem em culturas de células

Ex: Vírus da febre amarela selvagem.



# Ovos embrionados

---



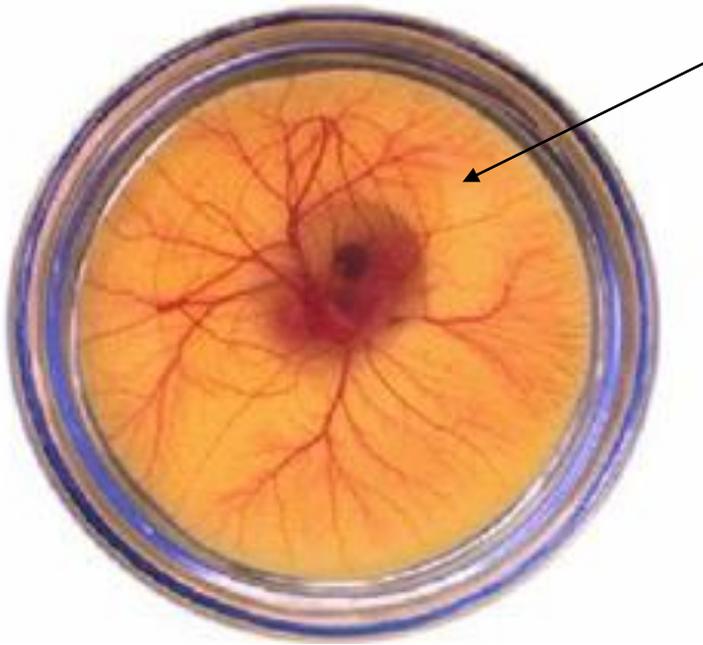
## Ovos embrionados

- Isolamento de vírus humanos e animais a partir de amostra clínica
- Produção de massa viral
- Produção de Vacinas

Ex: Vacina inativada para o vírus **Influenza** (gripe);  
Vacina atenuada contra **Febre Amarela**;



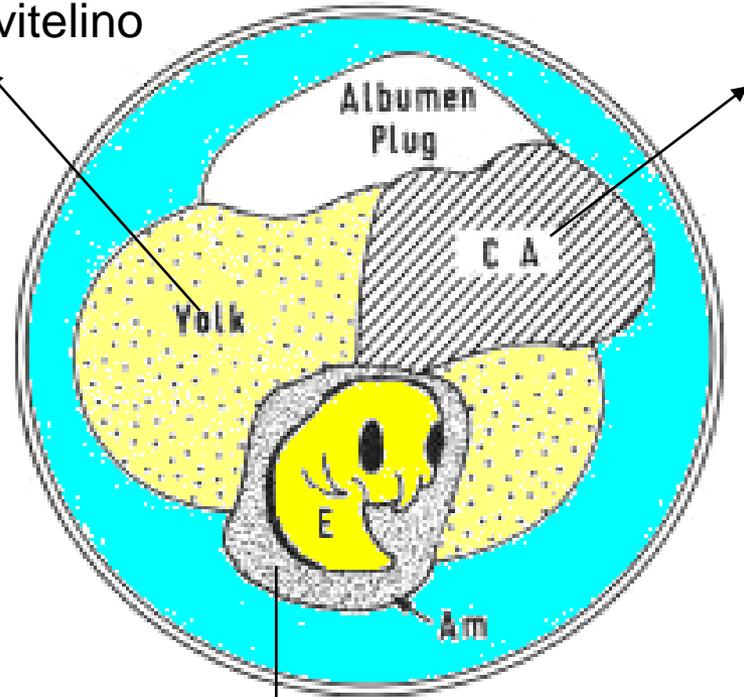
# Anatomia dos ovos embrionados



Membrana corioalantóica

Cav. alantóica

Saco vitelino

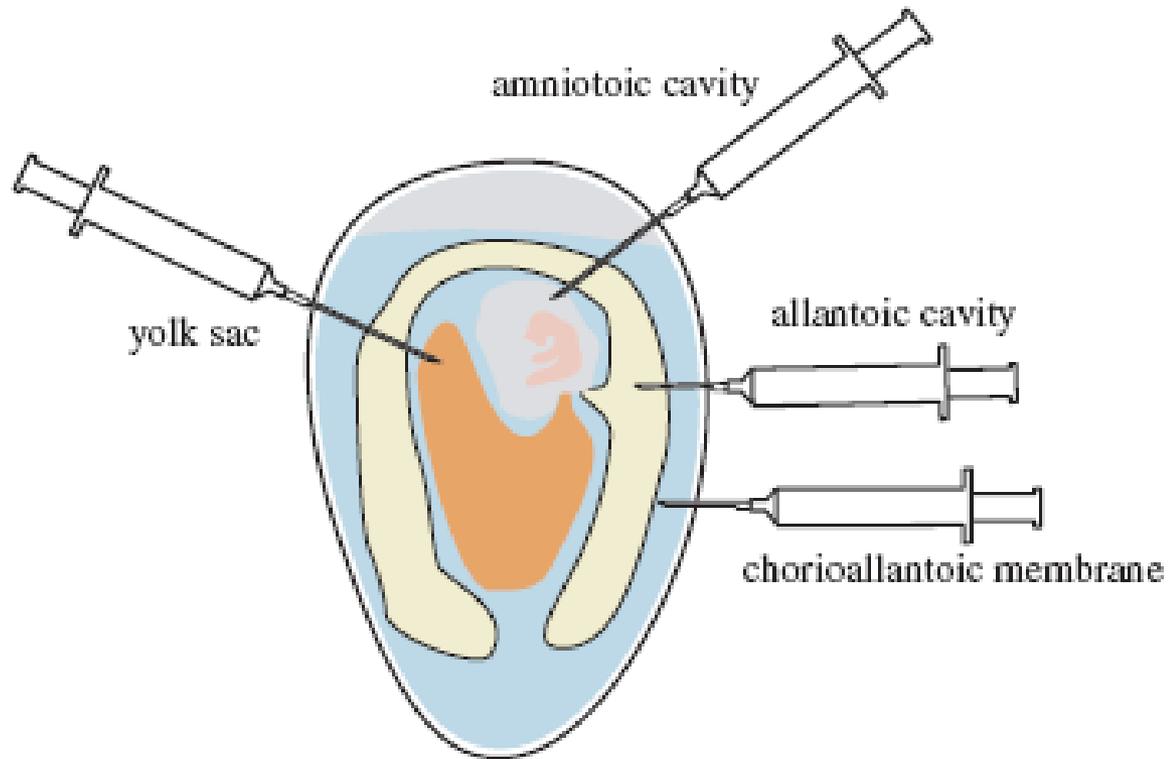


Embrião

Cav. amniótica

# Vias de inoculação

---



# Inoculação na cavidade amniótica

---

## Isolamento primário de vírus influenza humano



FIG. 50  
Inoculation into the amniotic cavity of the chick embryo.

# Inoculação na cavidade alantóica

- Isolamento vírus aviários (Influenza, Vírus da Doença de Newcastle)
- Propagação de vírus Influenza humano
- Preparação de vacinas



FIG. 45  
Inoculation into the allantoic cavity of the chick embryo.

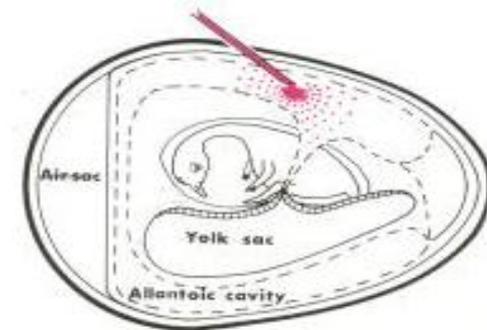
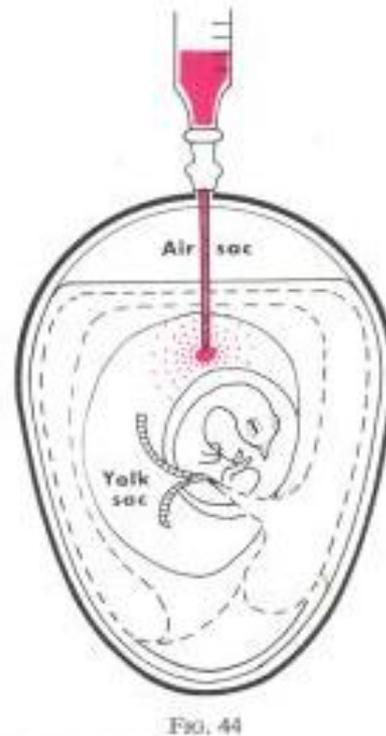
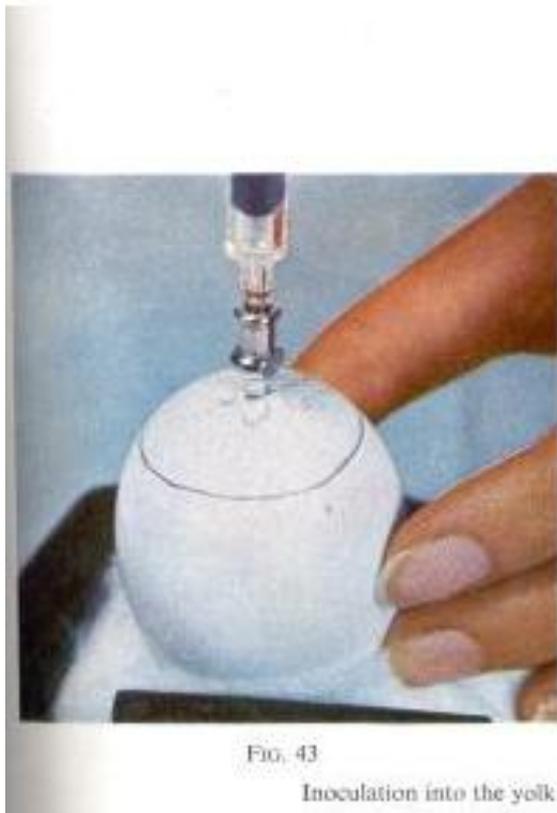


FIG. 46

# Inoculação no saco vitelino

## Produção de vacinas: vírus neurotrópicos



# Inoculação na membrana corioalantóica

---

**Isolamento e propagação de vírus que produzem lesões – *pocks* - (poxvírus e herpesvírus)**

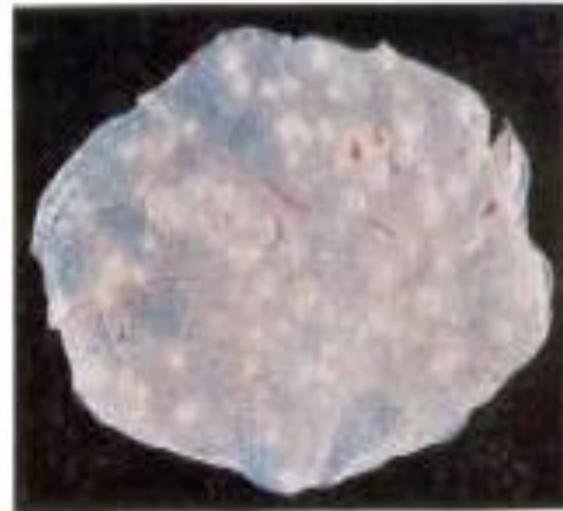
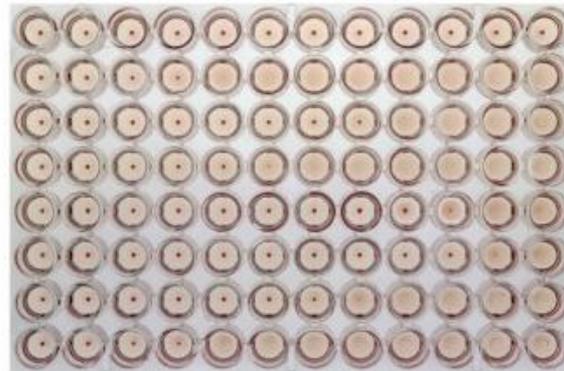


FIG. 49  
Part of the allantoic membrane of a thirteen-day-old chick embryo 96 hours after inoculation with the vaccinia virus. Notice the large yellow pocks. (*Life size.*)

# Vantagens do uso dos ovos embrionados

---

- Diversidade de tecidos
- Sistema imune imaturo
- Facilidade de observação da multiplicação viral:
  - Pocks (Ex.: Poxvírus, Herpesvírus)
  - Reação de Hemaglutinação (Vírus humanos e aviários)



# Cultura de células

Meados da década de 1990: avanços nos métodos de cultivo celular *in vitro*.

1948: Primeiro isolamento de vírus em cultura (Weller & Enders)

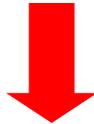


# Cultura de células

---



Tecido



Desagregação do tecido original

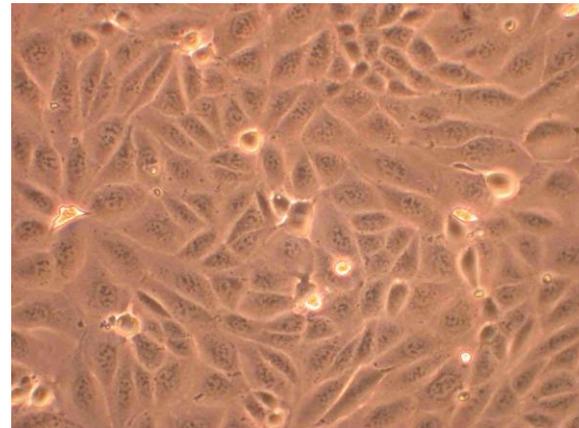
(Dissociação Mecânica e Enzimática Tripsina + EDTA)



Filtração



Cultura primária



# Cultura de células

## Meio Mínimo Essencial (MME)

- Glicose
- Bicarbonato (Tampão)
- Indicador de pH
- Íons ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ )
- Vitaminas
- Aminoácidos
- Antibióticos e antimicóticos
- Água
- Soro Fetal Bovino 10% Meio de cultivo  
2% Meio de Manutenção

## Condições Ambientais

- Temperatura (37 C)
- Umidade
- Níveis de  $\text{CO}_2$
- pH (7.2)

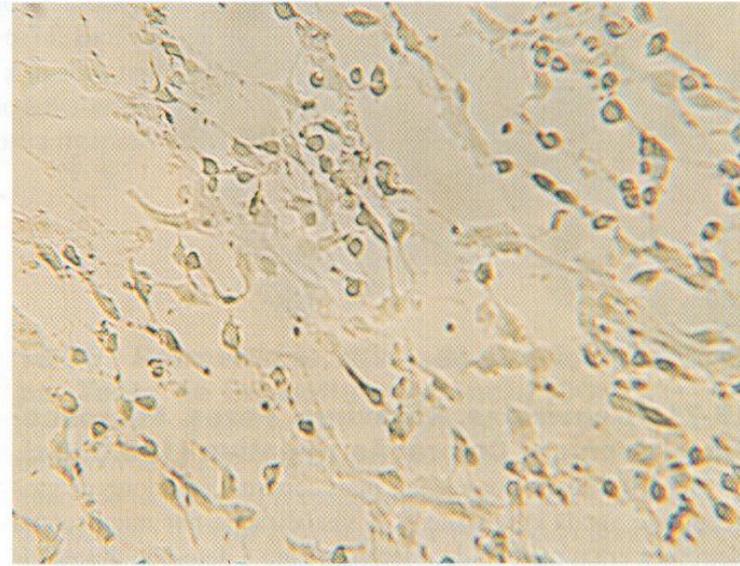
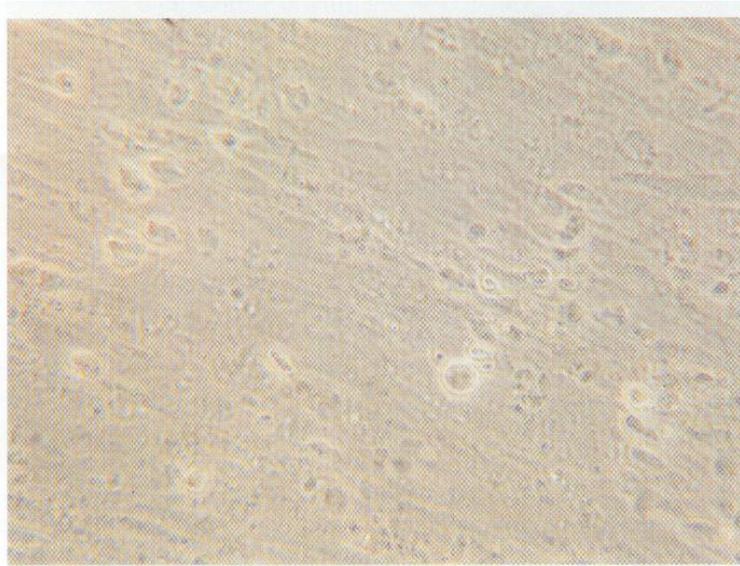


Linhagem celular	Origem	Isolamento
Hep2	Carcinoma epidermóide de laringe humana	Vírus entéricos e respiratórios
Vero	Rim de macaco verde africano	Vírus entéricos e respiratórios
MRC-5	Linhagem diplóide de pulmão de feto humano	Vírus entéricos e respiratórios
MDCK	Rim de cachorro	Vírus respiratórios
C6/36	Clone de linhagem de <i>Aedes albopictus</i>	Vírus da dengue
BHK-21	Rim de Hamster	Vírus da Raiva
LLC-MK2	Rim de macaco Rhesus	Vírus respiratórios e entéricos

# Efeito citopático

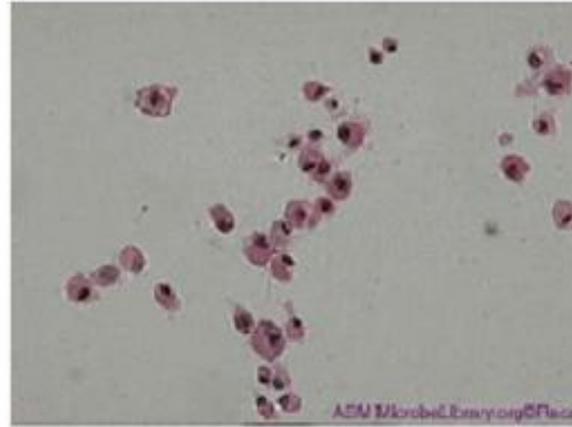
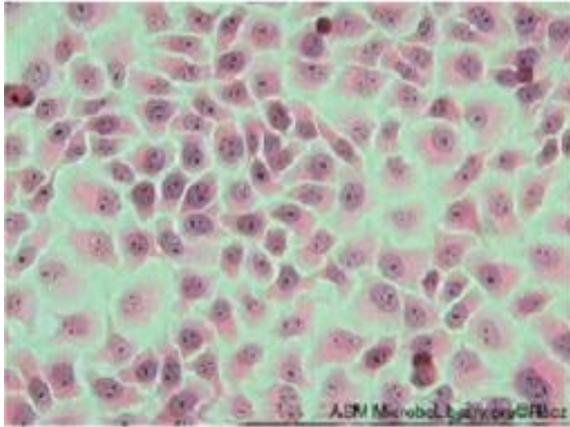
---

## Picornavírus em cultivo celular

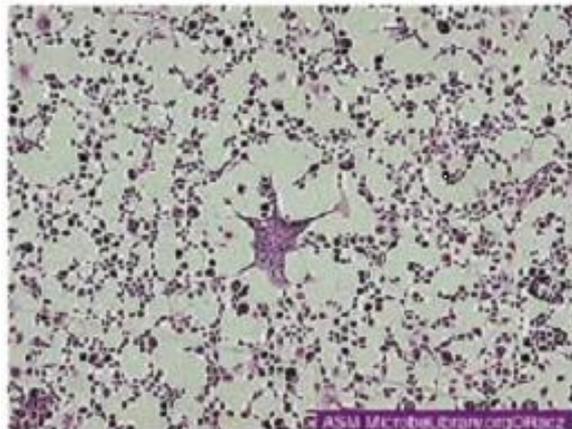


# Efeitos da replicação viral nas células hospedeiras (vírus citopáticos – ECP)

Células Vero infectadas com Poliovírus.



Células Vero infectadas com Herpesvírus.



# Identificação

---

- 1) Reação de Imunofluorescência
- 2) Reação de Immunoperoxidase
- 3) Hibridização *in situ*
- 4) Elisa
- 5) Reação de Hemaglutinação
- 6) Hemadsorção
- 7) PCR

# Métodos Rápidos

---

## Métodos diretos:

Detecção do vírus ou parte dele:

- Microscopia eletrônica, I.F, Elisa

Detecção do genoma viral:

- PCR

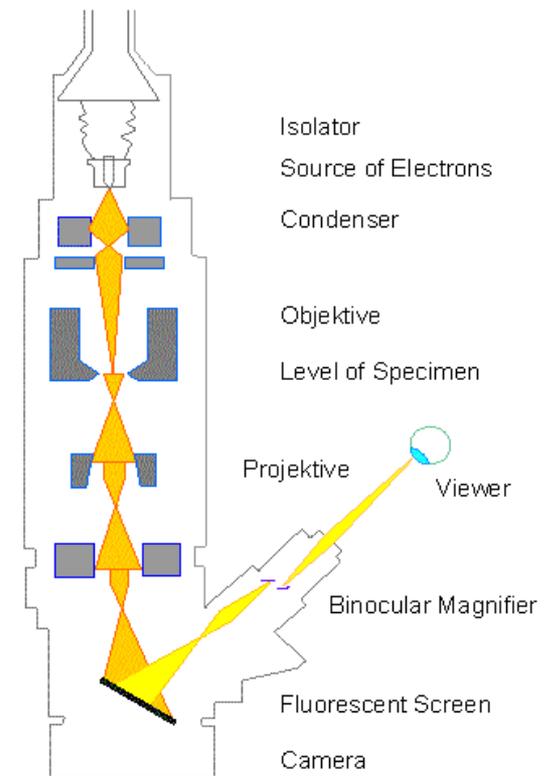
## Métodos indiretos:

Detecção de anticorpos no soro do paciente

# Microscopia eletrônica

- morfologia da partícula viral
- Alta concentração de vírus :  $10^6 - 10^8$  partículas virais/ml
- Amostras para diagnóstico :
  - cutâneas - líquido vesicular : herpesvírus  
verrugas: papilomavírus
  - material fecal: rotavírus

➤ **Coloração negativa:** amostra + corante de alta densidade eletrônica (ácido fosfotungstico) ⇒ grade de carbono ⇒ microscópio ⇒ o feixe de elétrons não penetra no corante, mas sim no material orgânico, que aparece claro sobre um fundo escuro.

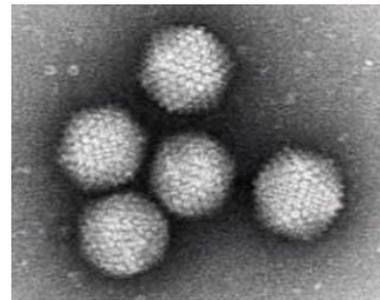


# Microscopia eletrônica

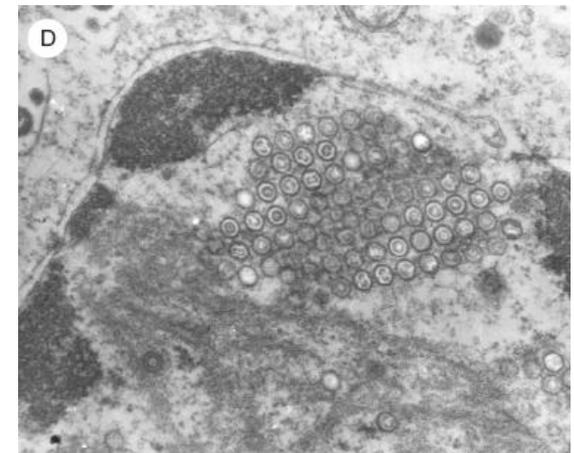
- Rápida identificação de vírus
- Baixa sensibilidade ( $10^6$ - $10^7$  partículas / mL).
- Aumento da sensibilidade: imunoeletromicroscopia, ultracentrifugação, anticorpos marcados com partículas de ouro (*imunogold*).



Fig. 1.8 Fotografia do microscópio eletrônico de transmissão 906E.  
(Cortesia de Carl Zeiss.)



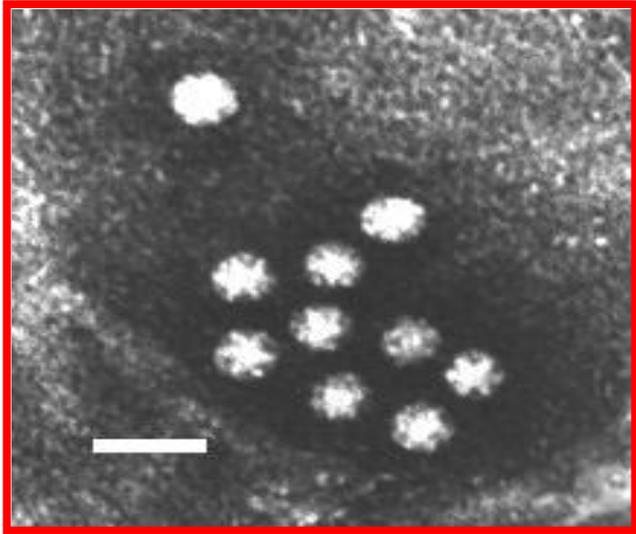
M.E: Adenovírus



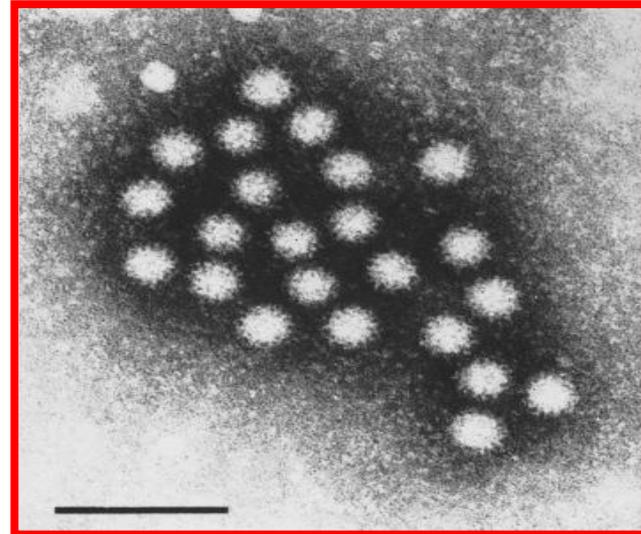
M.E: Herpesvírus  
em células de cultivo

# Diagnóstico laboratorial de vírus associados à gastroenterite

---



??



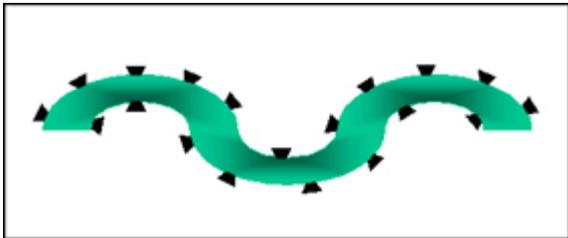
# Detecção do antígeno viral

## Antígeno

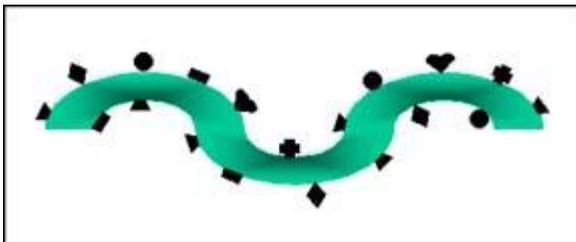
**Antígeno:** substância que reage com o produto da resposta imune específica

**Imunógeno:** substância que induz uma resposta imune

**Epítopo ou determinante antigênico:** porção do antígeno que combina com o produto da resposta imune específica



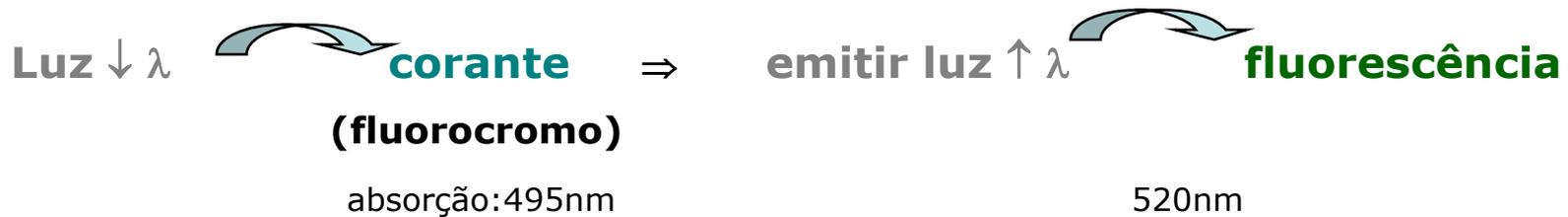
Ag com mesmo determinante antigênico repetido muitas vezes



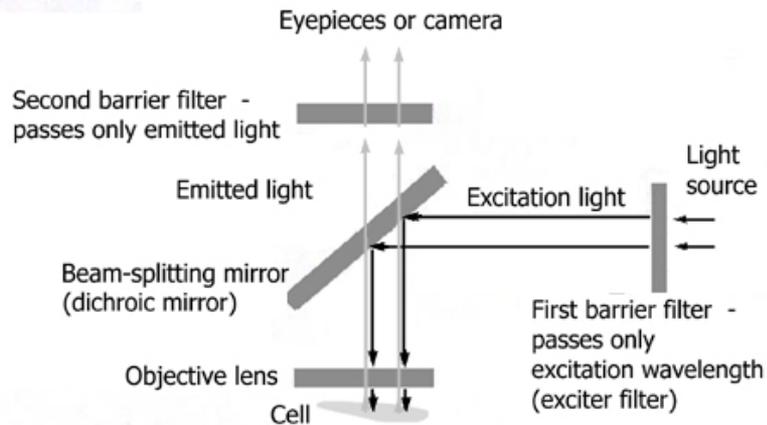
Ag com determinantes antigênicos diferentes

# Métodos rápidos: Imunofluorescência (IF)

- Substâncias capazes de armazenar energia luminosa e liberá-la mais tarde: isotiocianato de fluoresceína, **rodamina**.



REPRESENTA

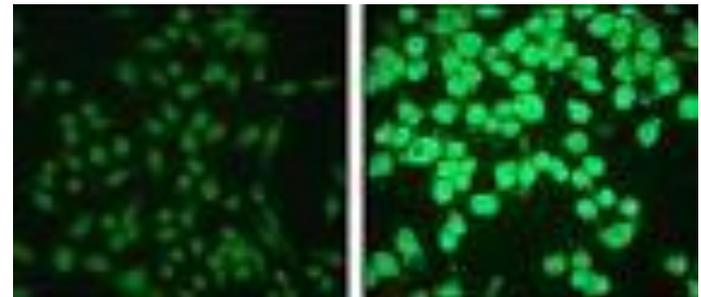
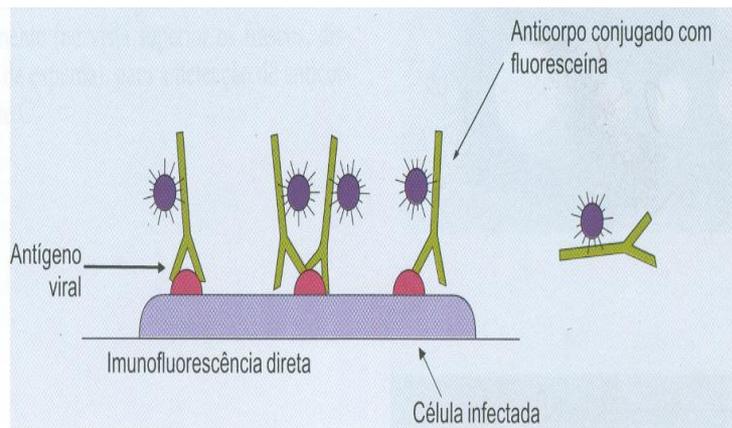


# Detecção do antígeno viral

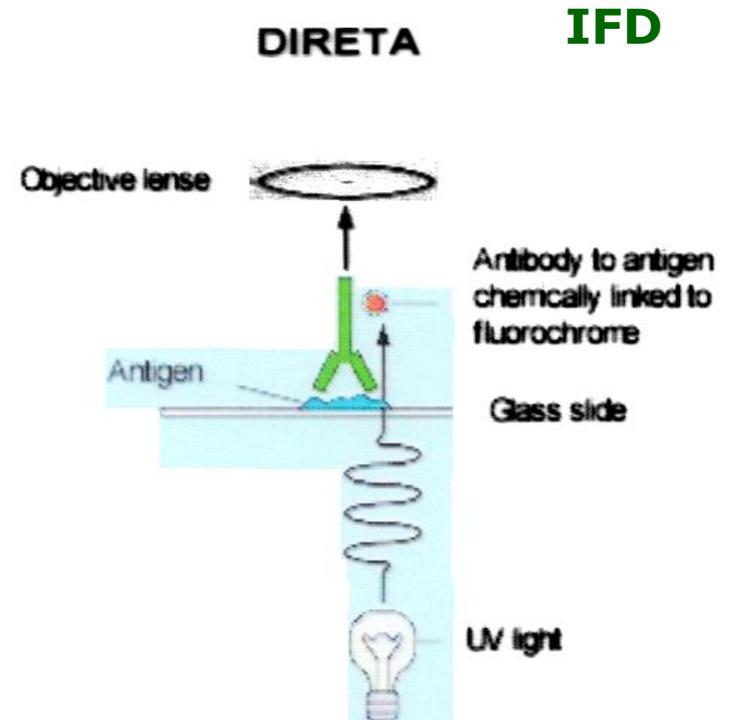
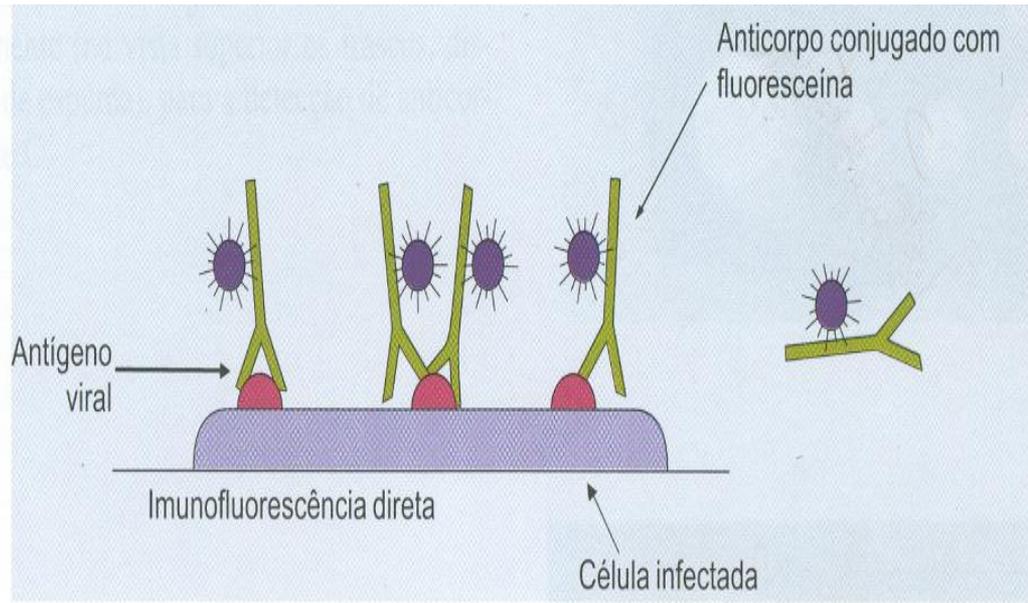
## IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF):

- **Detecção de Ag virais no interior das células:**  
aspirado de nasofaringe  
Corpúsculos de Negri  $\Rightarrow$  Raiva
- **Marcador da reação Ag - Ac é um corante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína , rodamina).**

**Amostra clínica + Ac - F  $\Rightarrow$  detecção de fluorescência por luz UV.**



# Reação de Imunofluorescência direta:



- pesquisa de Ag em células ou tecidos

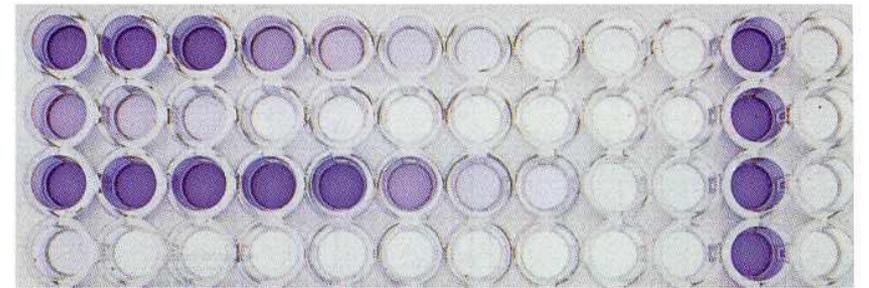
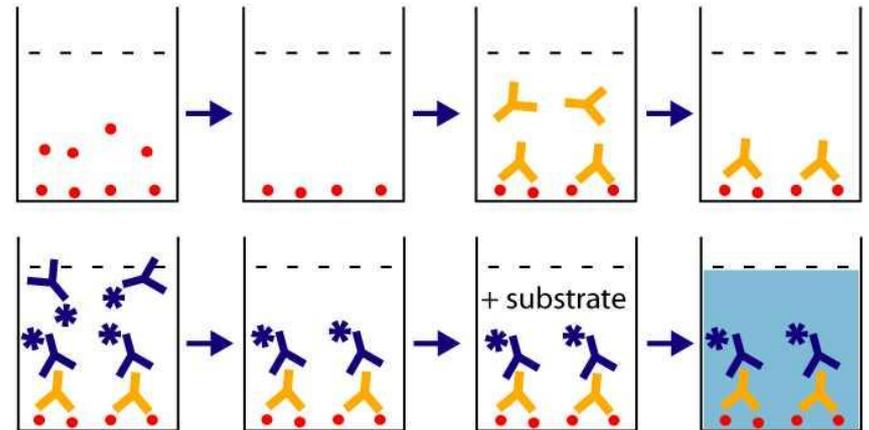
# Métodos rápidos

## Reações Imunológicas:

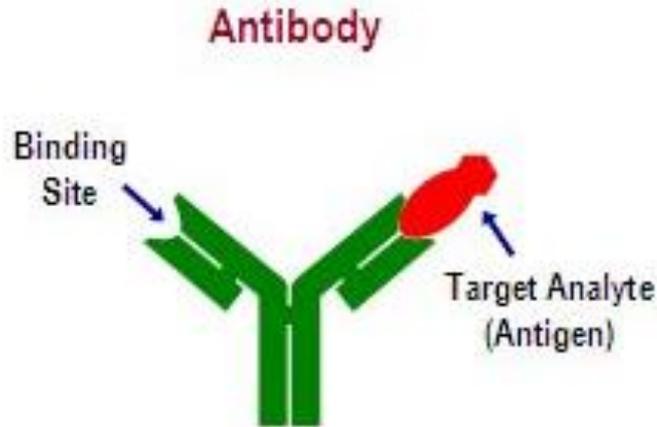
### ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

(EIE) :

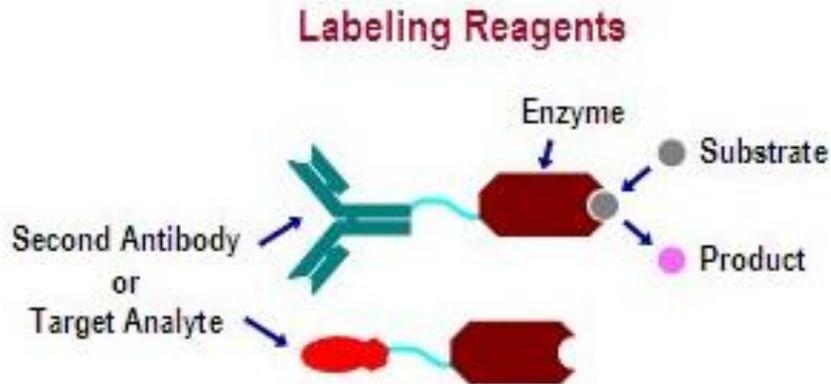
- **Detecção de Ag virais :**  
rotavírus, parvovírus
- **Marcador da reação Ag-Ac é**  
uma enzima (peroxidase,  
fosfatase alcalina).
- **Leitura se baseia no**  
desenvolvimento de cor pela  
adição do substrato à enzima.
- **Pode testar um grande número**  
de amostras simultaneamente.



# Ensaio Imunoenzimático (EIE): pesquisa de Ag



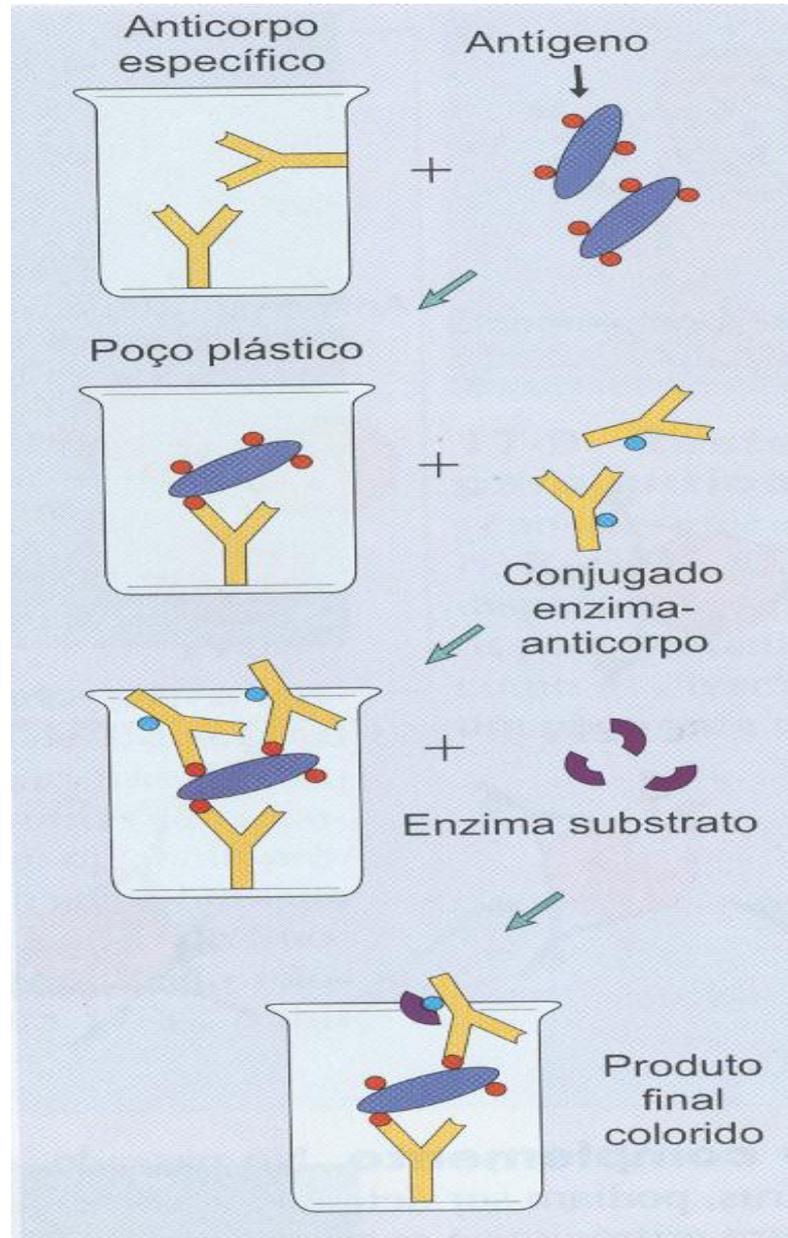
**Ac de captura: "capturar" o Ag na amostra**



**Conjugado: Ac ligado a uma enzima**

# Ensaio Imunoenzimático (EIE): pesquisa de Ag

(a) Sensibilização da microplaca ⇒  
**Ac de captura**



(b) **Amostra  
clínica**

(c) **conjugado**

(d) **substrato**

# Sistema de lavagem



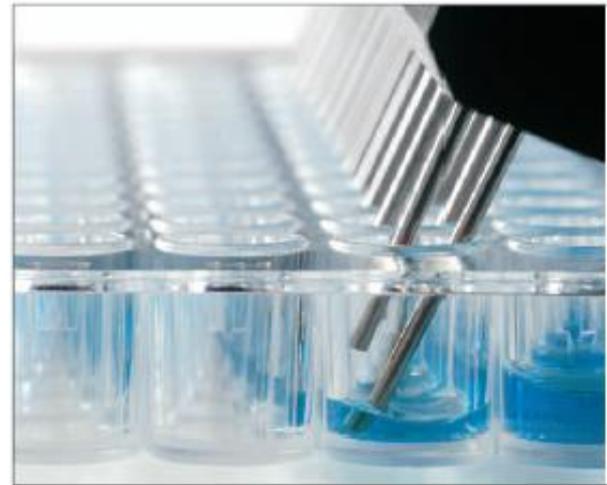
*Semi-automated wash system*



*Manual wash system*



*Proper positions of manual washer needles for dispensing wash solution*



*Proper position of manual washer needles for aspirating liquid*

## Proper Pipetting



*Proper position to dispense reagents into empty wells using a multichannel pipette; in the lower corner of the wells*



*Proper position to dispense reagents into wells containing liquid using a multichannel pipette; above the liquid*

---

# Ensaio Imunoenzimático (EIE): pesquisa de Ag



## Leitor de microplaca: ELISA quantitativo

→ **cut - off** = Média das D.O. dos controles negativos **X 2.1**

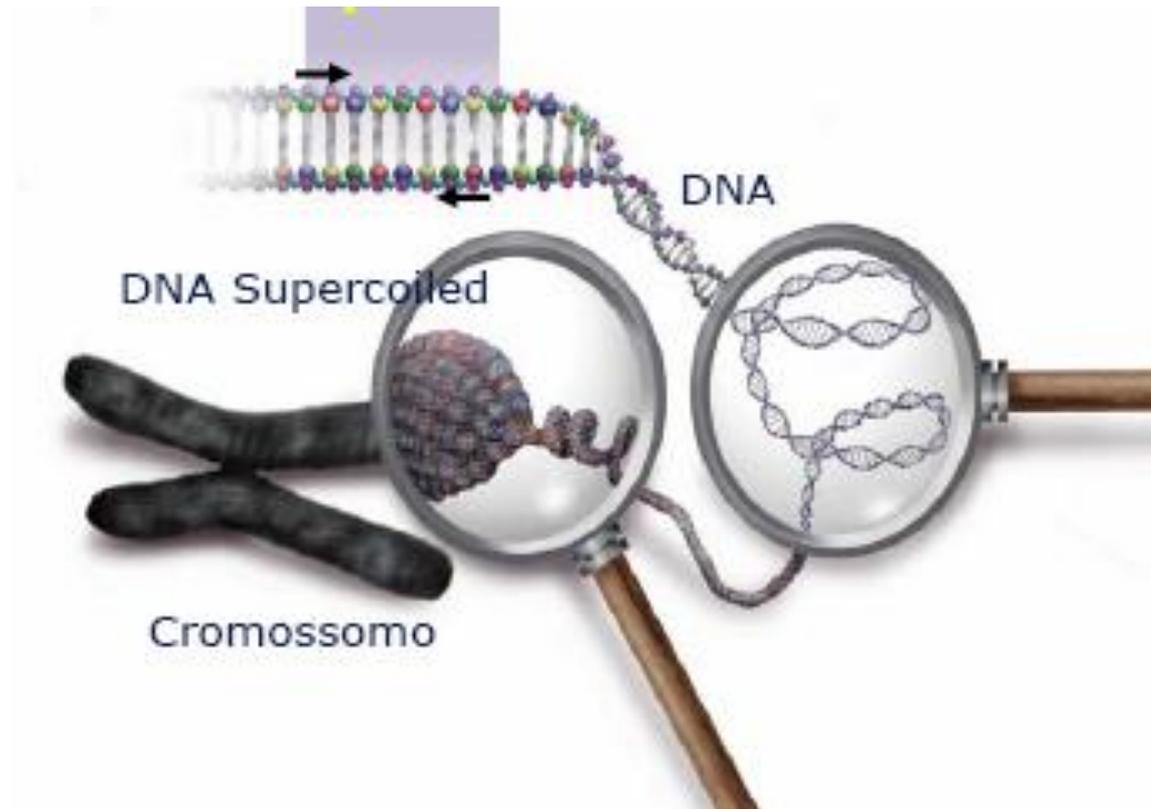
Amostras com  $DO > \text{cut-off}$  ⇒ positivas

Amostras com  $DO < \text{cut-off}$  ⇒ negativas

# Métodos rápidos

## Detecção do genoma viral:

- Reação em cadeia pela polimerase (PCR)



# Técnicas de Biologia Molecular:

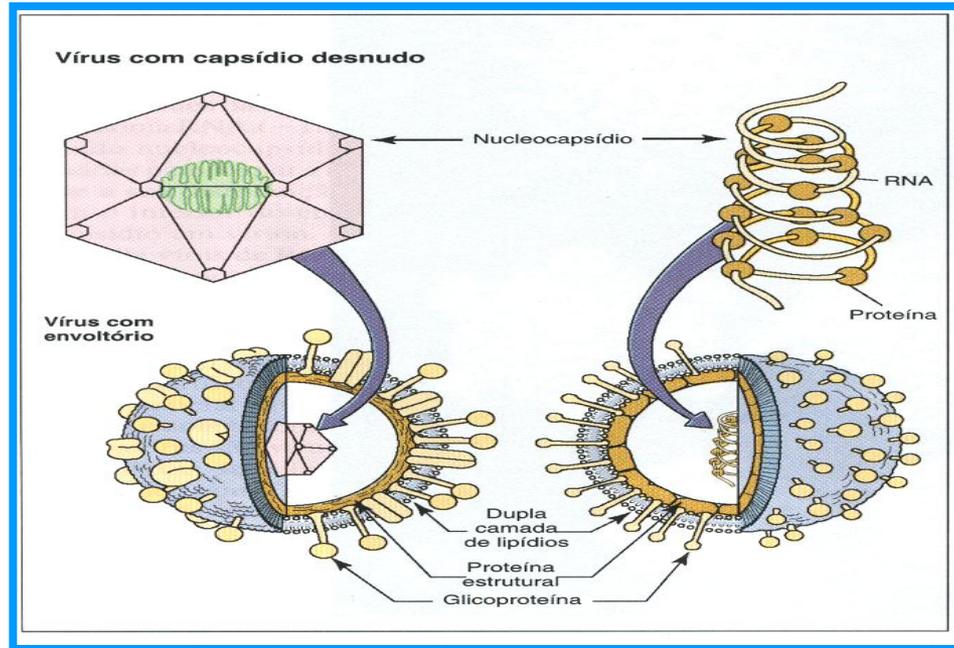
## PRINCÍPIO

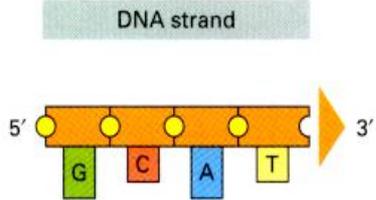
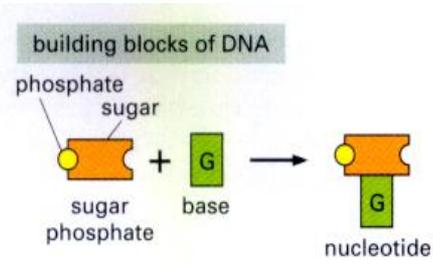
Todo ser vivo tem sequências de ácido nucléico que são específicas e podem ser detectadas por uma reação de amplificação

Estrutura da partícula viral:

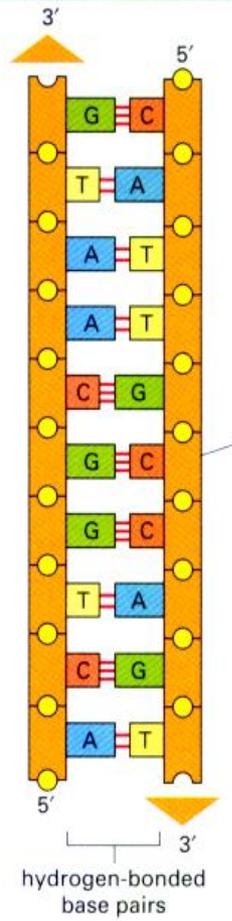
Vírus não envelopados:  
genoma + capsídeo ⇒  
nucleocapsídeo

Vírus envelopados:  
genoma + capsídeo +  
envolpe com glicoproteínas

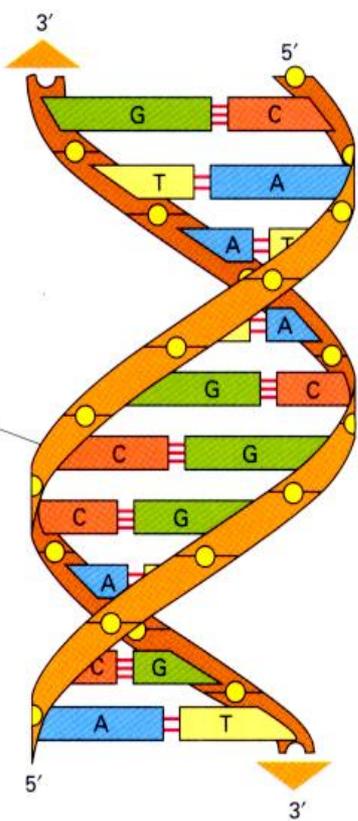




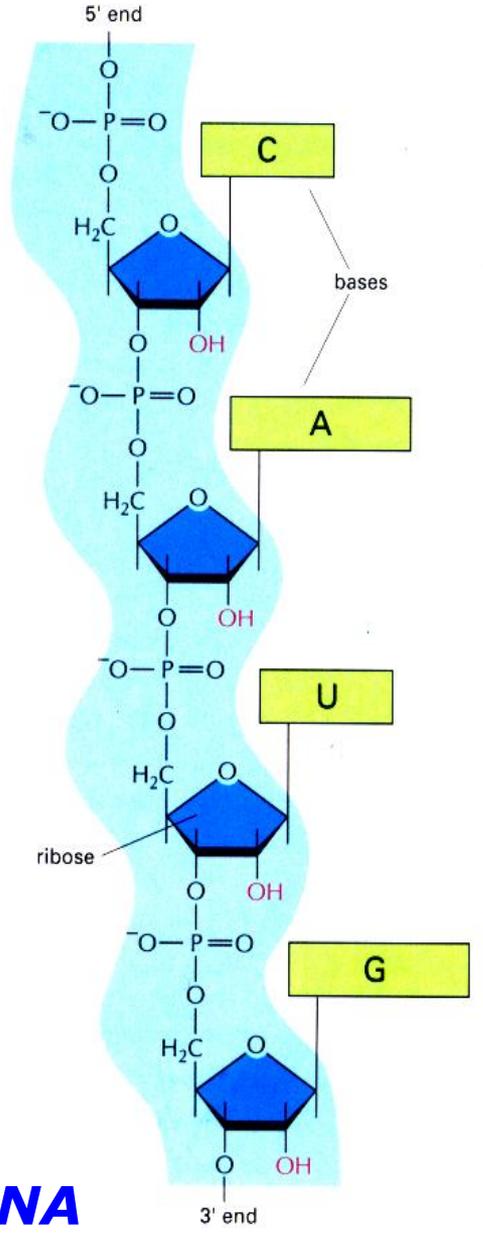
**double-stranded DNA**



**DNA double helix**



**DNA**



## A detecção do genoma viral é particularmente importante:

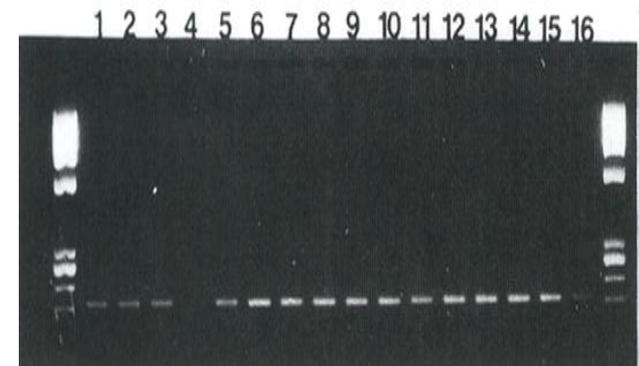
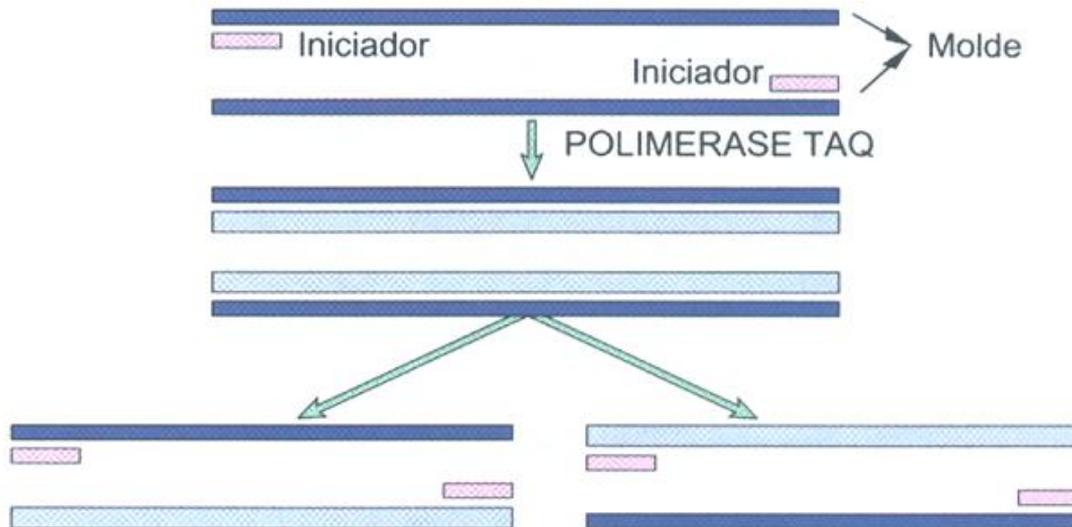
---

- Para o estudo de vírus que não podem ser isolados em cultura de células, como os papilomavírus e alguns agentes associados a gastroenterites,
- Para vírus com alta diversidade antigênica, como os enterovírus, o que dificulta a utilização de técnicas sorológicas de detecção de antígeno,
- A análise do genoma viral diretamente da amostra clínica pode ser vantajosa principalmente para aqueles vírus com genoma RNA, que podem sofrer mutações através de sucessivas passagens *in vitro*.

# Reação em cadeia pela polimerase ( PCR)

- Método para produzir cópias de uma segmento de DNA específico
- Polimerização é feita por uma *DNA polimerase* termoestável
- São utilizados *dois "primers"*, que delimitam o segmento amplificado e determinam o crescimento exponencial do número de moléculas de DNA

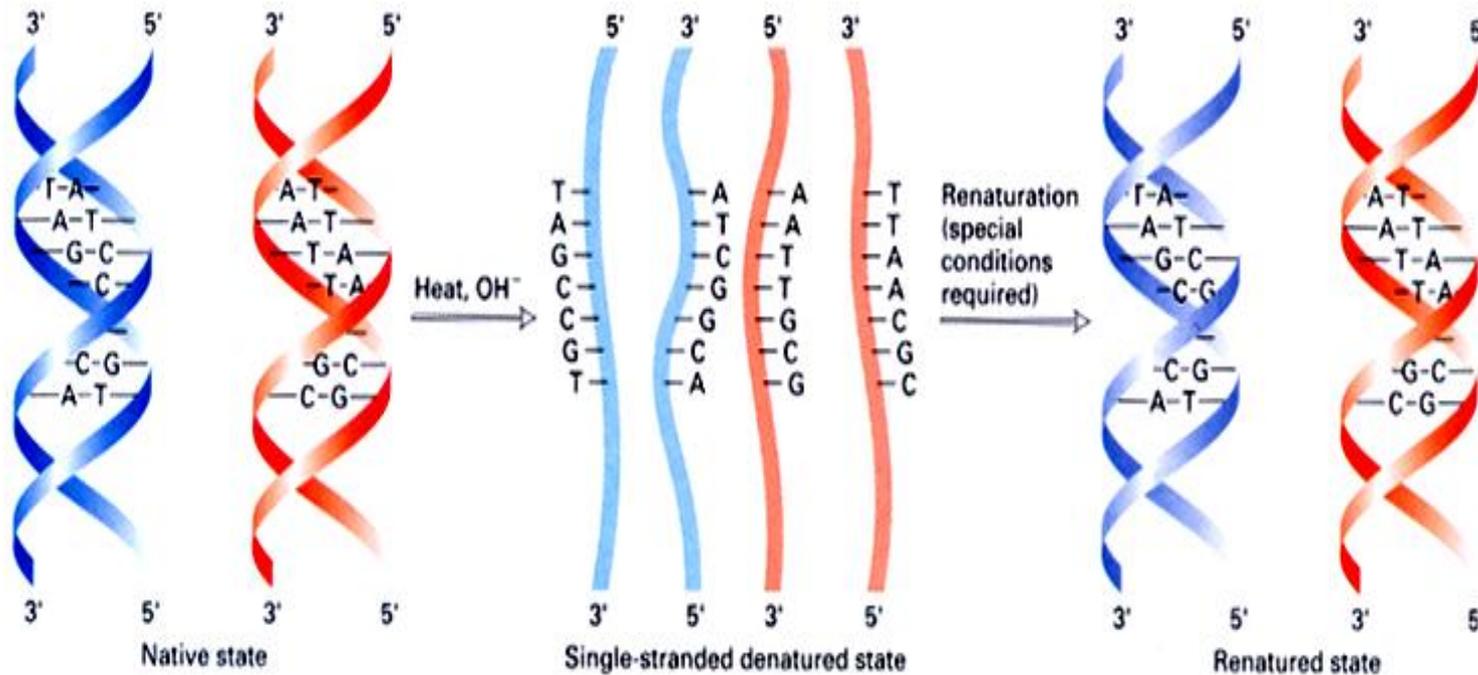
## REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE



# Propriedade Física do DNA

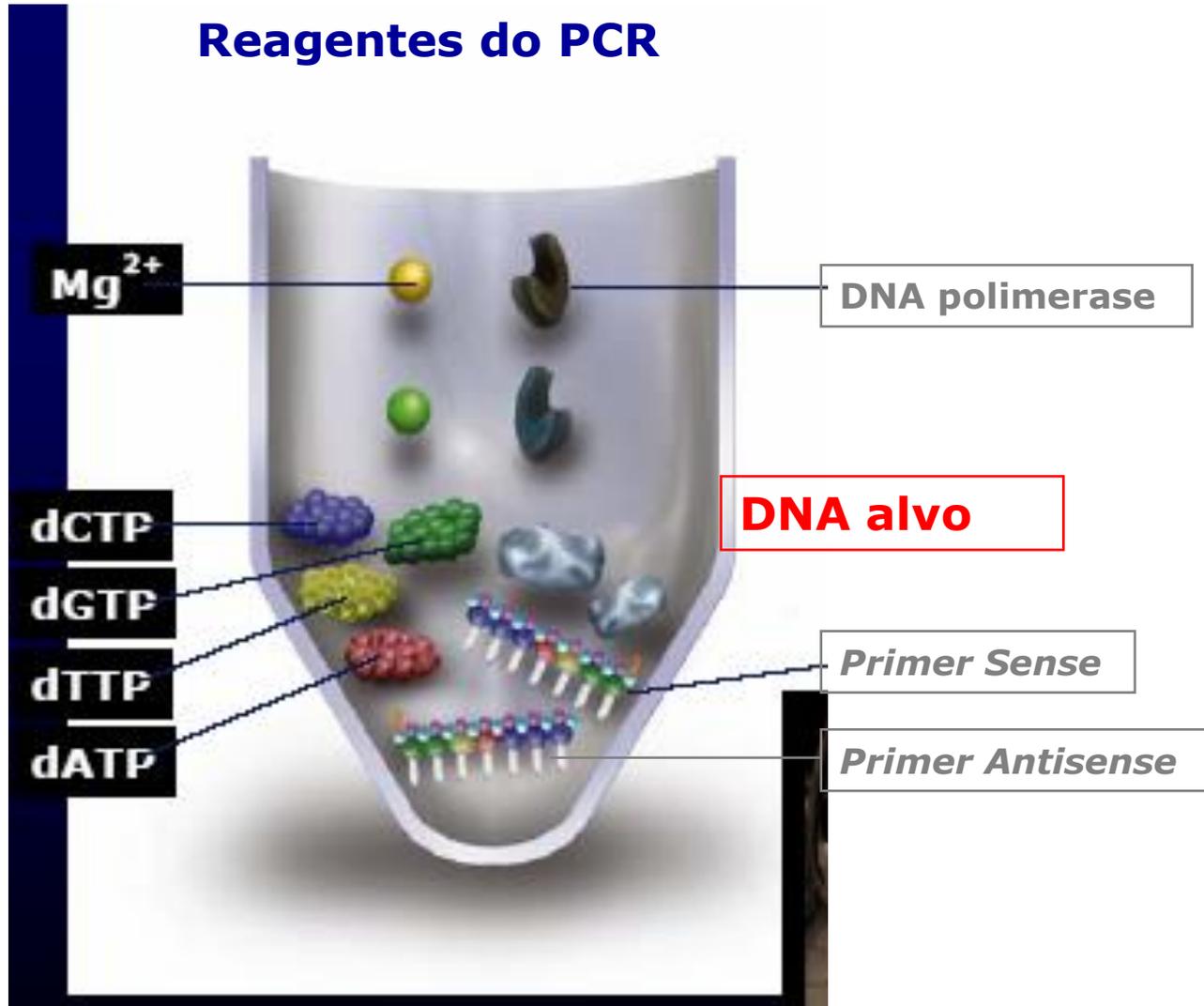
As duas fitas da dupla hélice podem ser *reversivelmente* separadas quando as **PONTES DE HIDROGÊNIO** são rompidas. Esse processo é denominado **DESNATURAÇÃO**.

A **renaturação** ocorre quando se volta às condições físico-químicas iniciais .



# Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

## Reagentes do PCR



# Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

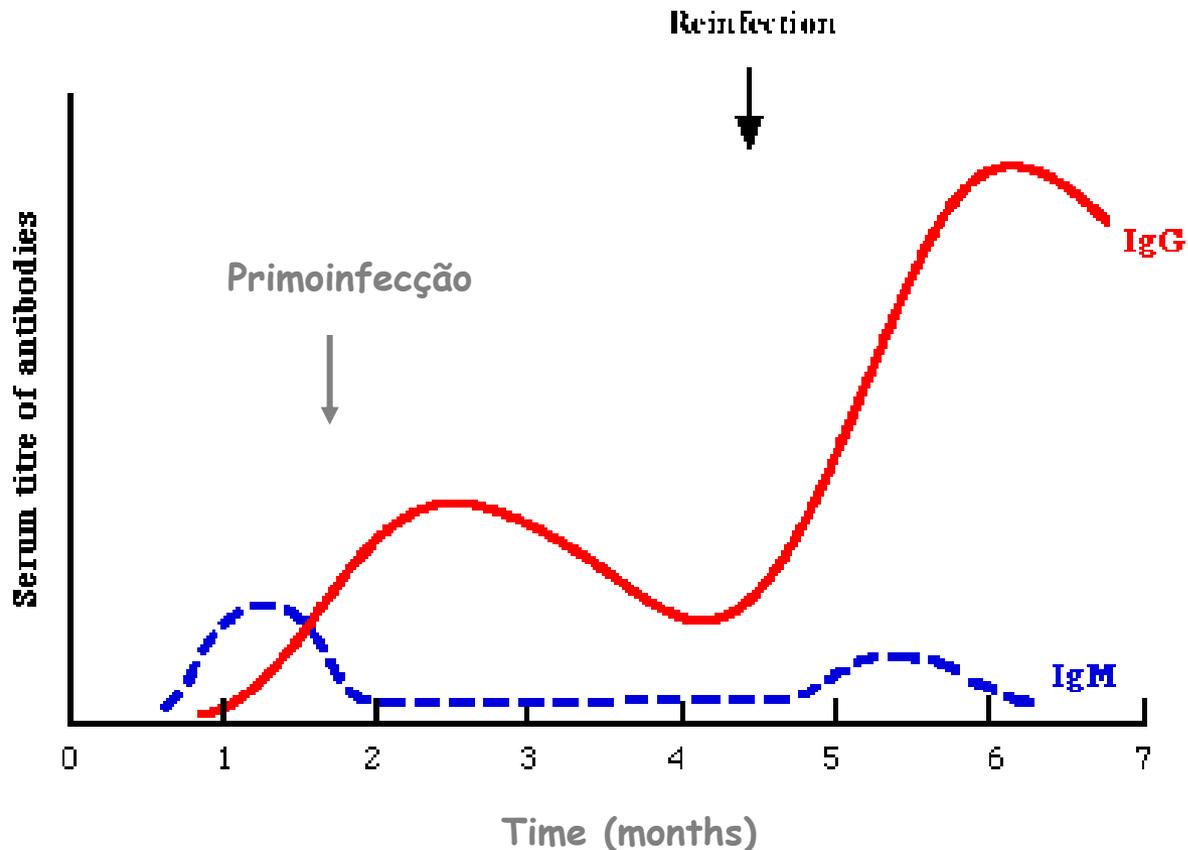
---

**Vídeo**

# Métodos indiretos: Detecção de Ac no soro

➤ Classe de anticorpos: **IgG** (anticorpos de memória)

**IgM** (infecções agudas)



# Métodos indiretos: Detecção de Ac no soro

---

## Diagnóstico de infecção recente:

- ❖ **Detecção de IgM específica**
- ❖ **Conversão sorológica: soro de fase aguda**  
**soro de fase convalescente**

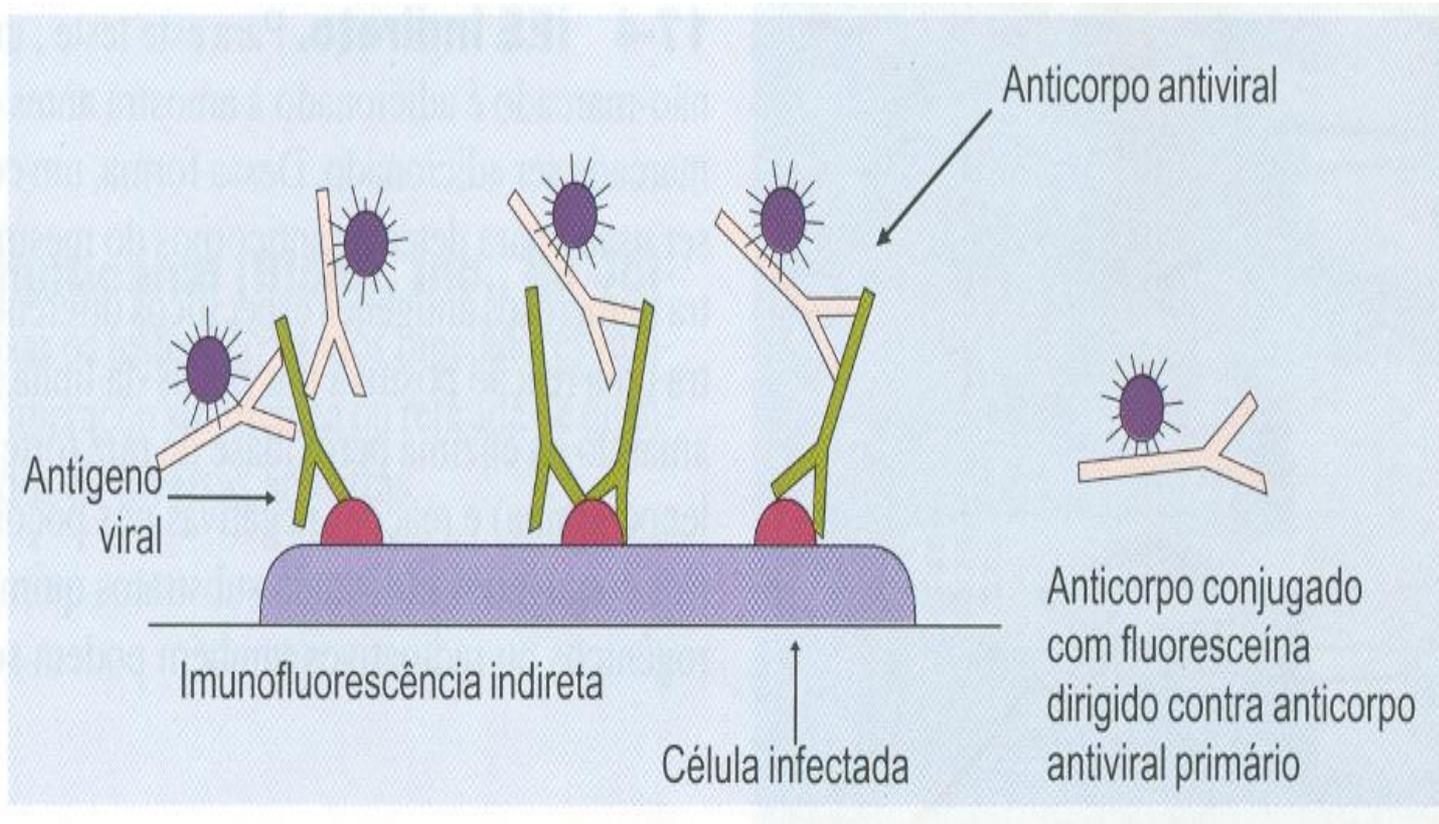
Observar um aumento, de pelo menos 4 vezes, no título de anticorpos do soro de fase convalescente em relação ao soro de fase aguda

## Reações Imunológicas:

- **Imunofluorescência (IFI)**
- **Ensaio Imunoenzimático (EIE)**

# Reação de Imunofluorescência indireta:

## IFI



# Ensaio Imunoenzimático Indireto (EIE):

## pesquisa de Ac

