



# ***Diagnóstico Viroológico***



# Para que serve?



# Importância do Diagnóstico Laboratorial



- Diferenciação de agentes que causam a mesma síndrome clínica
- Identificação de patógenos novos
- Diferenciação de fases de doença
- Triagem e avaliação de tecidos e órgãos
- Imunidade pós vacinal
- Vigilância epidemiológica
- Estudo epidemiológico
- Iniciar tratamento específico



# Tipos de métodos diagnósticos



**Métodos Direitos**

Pesquisam elementos da partícula viral (antígenos, genoma, partícula inteira)

**Métodos Indireitos**

Pesquisam RESPOSTA do hospedeiro (Anticorpos)

# Tipos de métodos diagnósticos

---



**Métodos Clássicos**



**Isolamento viral em sistema hospedeiro**

**Métodos Rápidos**



**Imonológicos  
Biologia Molecular  
Microscopia eletrônica**

# Tipos de Amostras



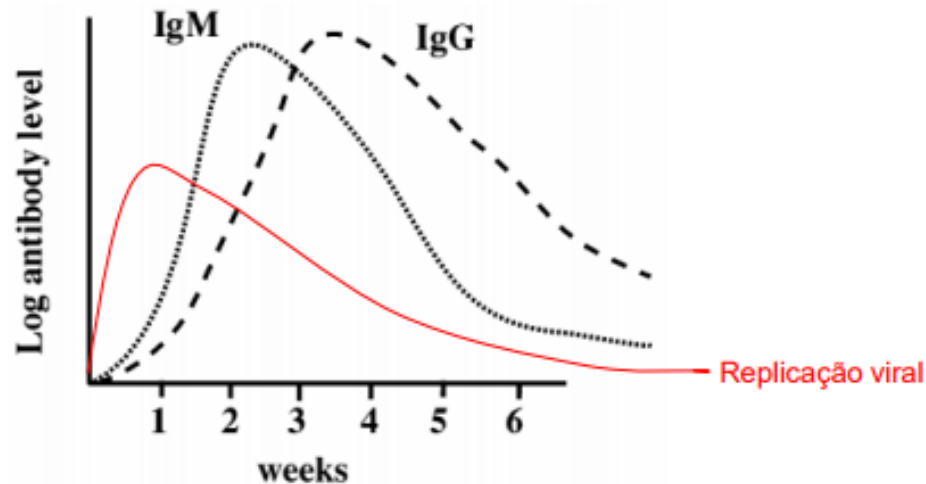
Suspeita clínica



# Tipos de Amostras



**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).

# Métodos clássicos: Isolamento viral

---



O que são vírus?



“Vírus: pequenos *parasitas intracelulares obrigatórios* que *não possuem metabolismo próprio*. Os vírus utilizam o aparato enzimático da célula hospedeira para síntese de seus componentes e sua perpetuação na natureza.”



# Métodos clássicos: Isolamento viral

---



- Animais de laboratório (desuso)



- Cultivo celular



Cada tipo de vírus vai exigir uma cultura celular diferente!



- Ovos embrionados

# Cultivo Celular



Tecido



Tratamento  
mecânico  
e enzimático



Meio de cultura



***Efeito Citopático (ECP):  
alterações que a replicação  
viral causa à célula hospedeira***

Cultura Primária  
Cultura Diplóide  
Cultura imortal

# Efeitos Citopáticos (ECP)



Vírus que causam ECP

Célula não infectada



- lise
- arredondamento
- vacuolização
- formação de sincícios
- inclusões
- picnose
- apoptose

Célula após infecção por vírus citopático



Vírus que não causam ECP



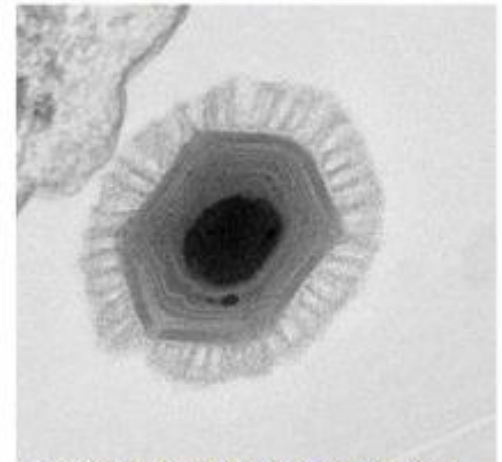
Identificação por outros métodos laboratoriais



# Microscopia eletrônica

- Permite a visualização de partículas víricas viáveis e também inviáveis
- Aplicável virtualmente a todos os vírus
- Identificação definitiva do agente
- Desvantagens:
  - Caro
  - Baixa sensibilidade
  - Mão de obra especializada

*Megavirus chilensis*



Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Megavirus>

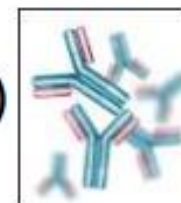
# Diagnóstico Imunológico



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)

# Diagnóstico Imunológico

## Antígeno

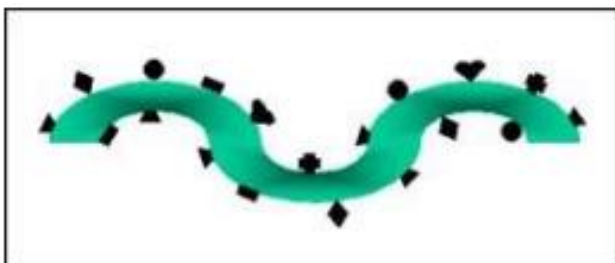
**Antígeno:** substância que reage com o produto da resposta imune específica

**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

# Diagnóstico Imunológico

---



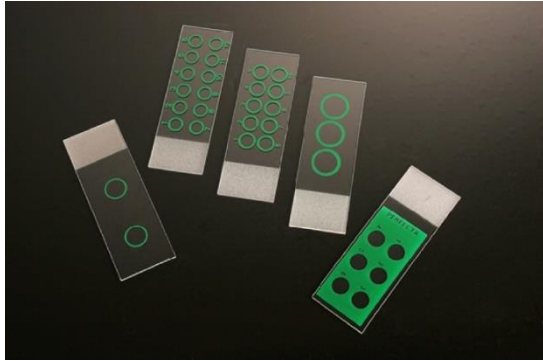
***IMUNOFLUORESCÊNCIA  
DIRETA***

**Detecção de ANTÍGENOS  
virais no interior das  
células**

***IMUNOFLUORESCÊNCIA  
INDIRETA***

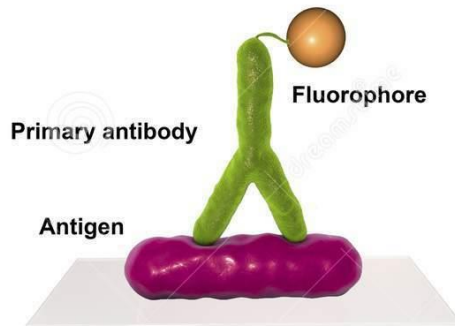
**Detecção de ANTICORPOS**

# Diagnóstico Inmunológico

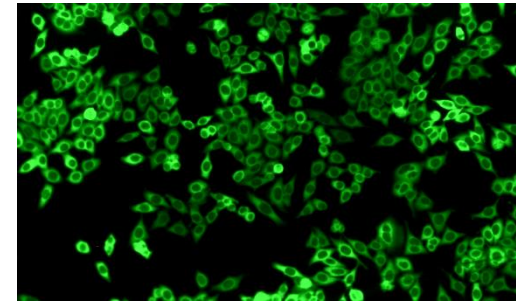
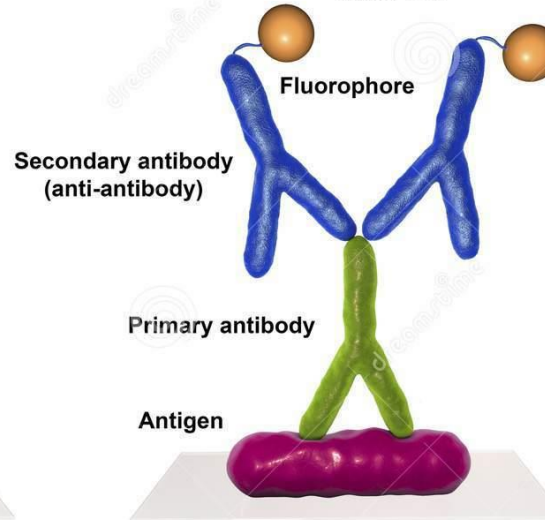


## Immunofluorescence

Direct



Indirect



Download from  
Dreamstime.com

This watermarked comp image is for previewing purposes only.

ID 100141961

© Kateryna Kon | Dreamstime.com

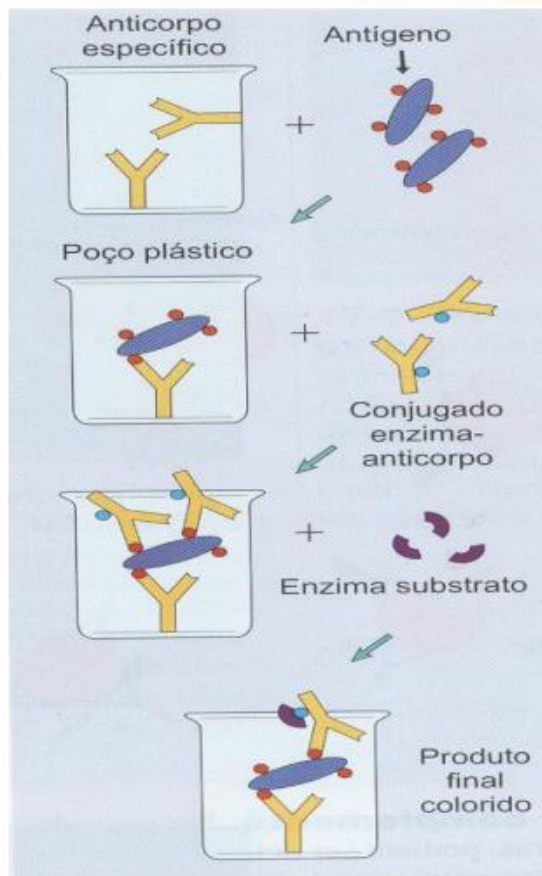


# Diagnóstico Imunológico

## ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DIRETO

Detecção de **ANTÍGENOS** virais em fluidos (ex. sangue)

(a) Sensibilização da microplaca ⇒  
Ac de captura



(b) Amostra clínica

(c) conjugado

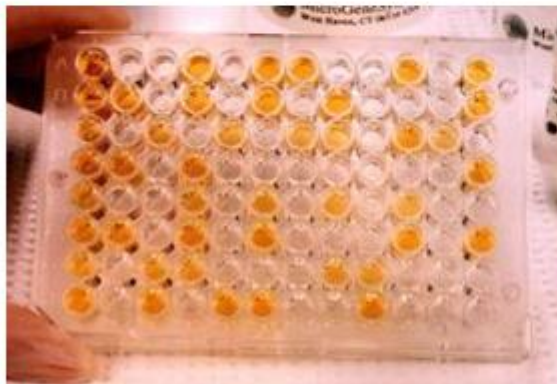
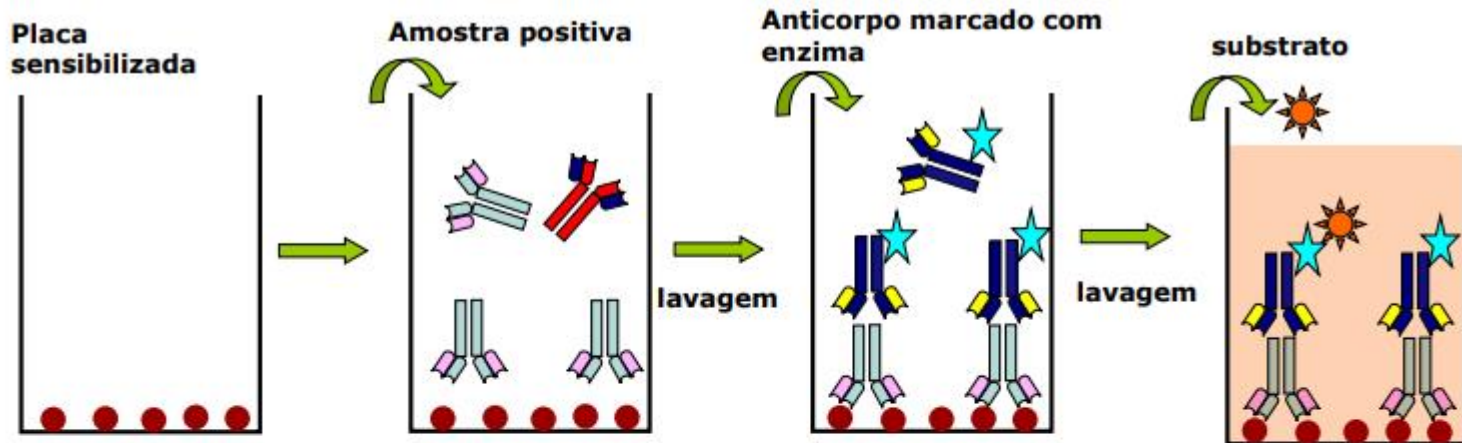
(d) substrato

Produto final colorido

# Diagnóstico Imunológico

## ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO

Detecção de **ANTICORPOS**



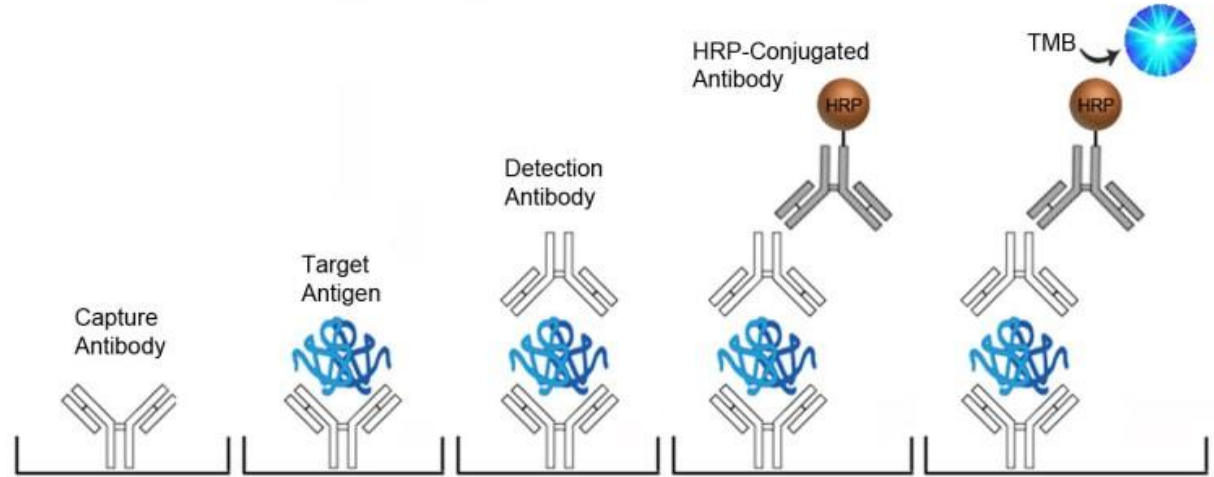
Leitor de microplaca:  
espectofotômetro



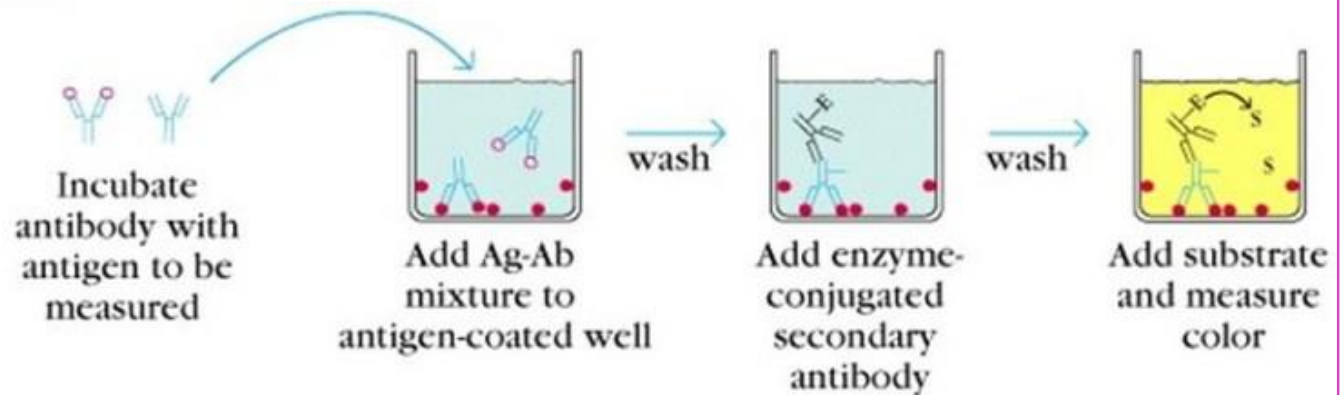
# Diagnóstico Imunológico



## Ensaio imunoenzimático sanduíche



## Ensaio imunoenzimático competitivo



# Diagnóstico Imunológico



# Diagnóstico Imunológico

## TESTE IMUNOCROMATOGRAFICO

### TESTE RÁPIDO

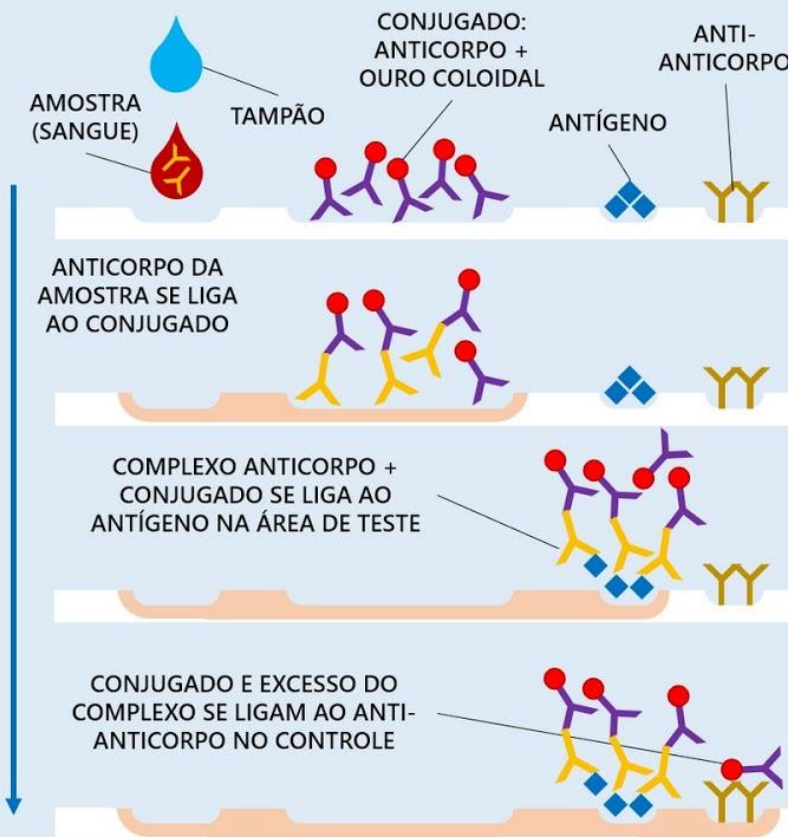


O TESTE RÁPIDO É UM TESTE DE IMUNOCROMATOGRAFIA QUE PERMITE DETECTAR RAPIDAMENTE A PRESENÇA DO ANTÍGENO OU ANTICORPO NA AMOSTRA.

O TESTE RÁPIDO É PENSADO NA FACILIDADE DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE PARA COLETA EM CAMPO, ALÉM DE SER FÁCIL DE USAR, DISPENSANDO TÉCNICAS COMPLICADAS OU VÁRIOS REAGENTES.

HÁ VÁRIOS TIPOS DE TESTES RÁPIDOS ALÉM DO FLUXO LATERAL: DUPLA MIGRAÇÃO (DPP); IMUNOCONCENTRAÇÃO; FASE SÓLIDA. CADA UM ADAPTADO A UM TIPO DE PESQUISA.

### IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL



### INTERPRETAÇÃO

POSITIVO



NEGATIVO

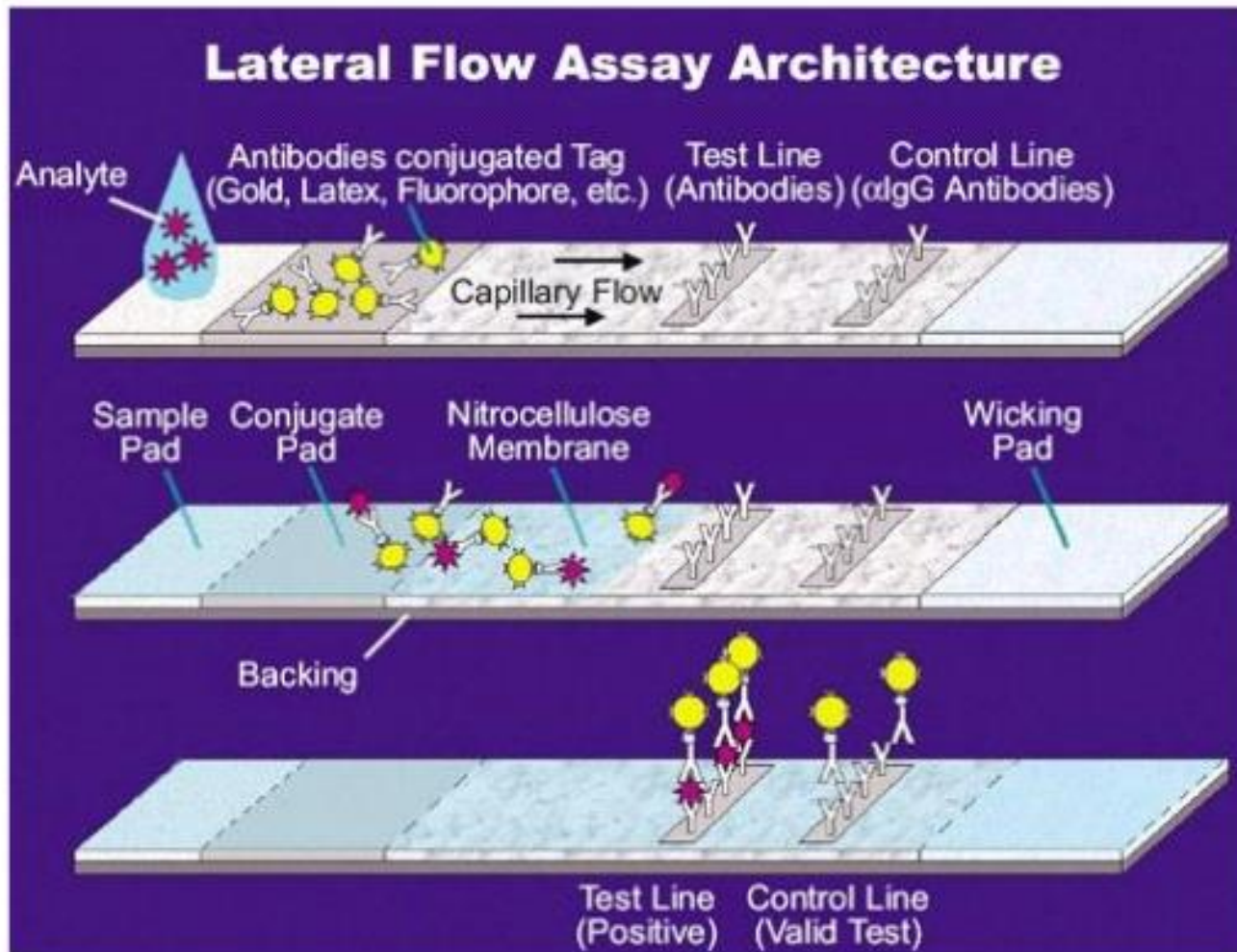


INVÁLIDO (NECESSÁRIO REPETIÇÃO)



# Diagnóstico Imunológico

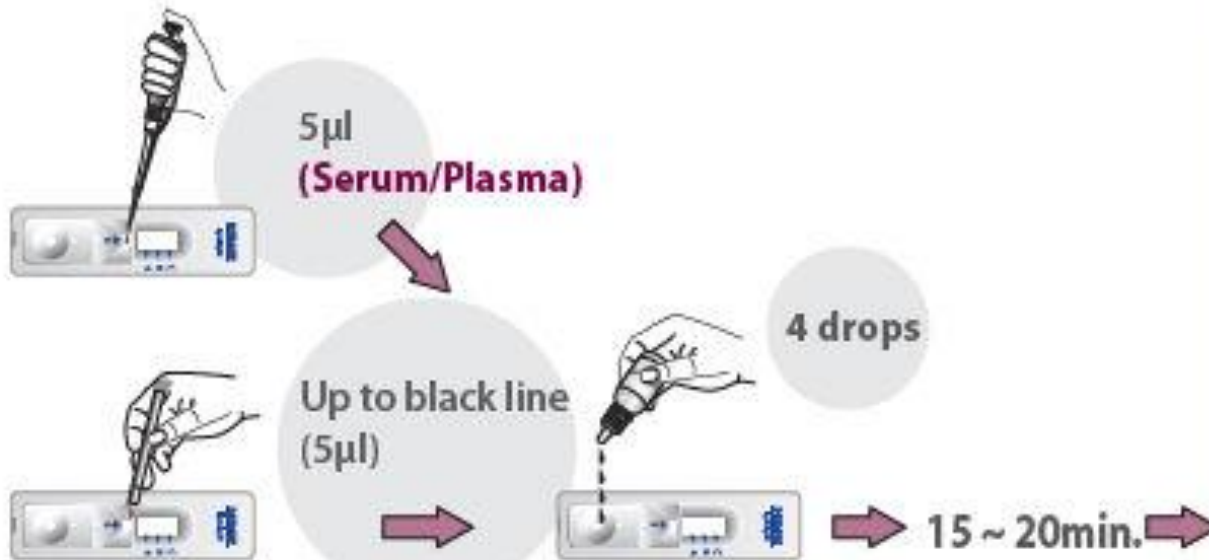
## IMUNOMIGRAÇÃO RÁPIDA



# Diagnóstico Imunológico

## Test Procedure

### 1. Dengue IgG/IgM



### 2. Dengue IgG/IgM WB



## Interpretation

### Positive

IgM Positive  
(Primary dengue Infection)



IgG Positive  
(Secondary or past dengue Infection)



IgG and IgM Positive  
(Late or past dengue Infection)



### Negative



# Diagnóstico rápido

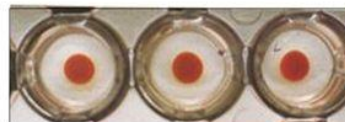
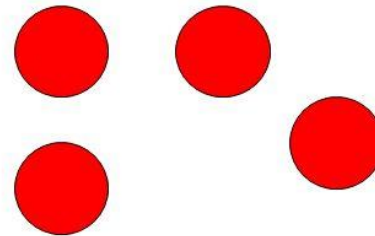


Hemaglutinação:

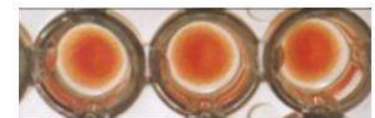
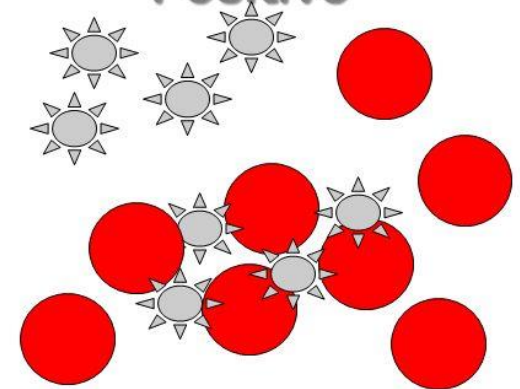
- Capacidade de alguns vírus em aglutinar hemácias
- Rápida, fácil execução
- Não identifica exatamente um vírus; restrito

## Hemaglutinação Direta

Negativo



Positivo





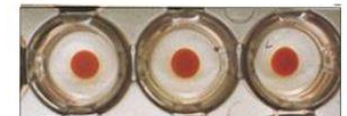
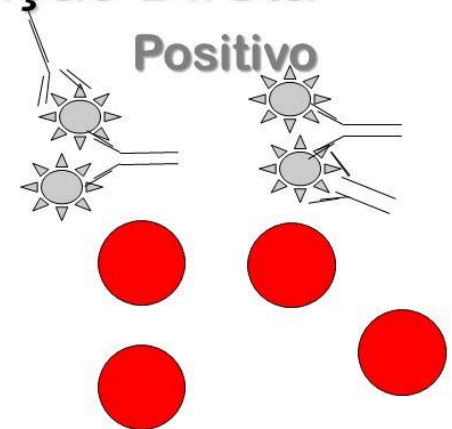
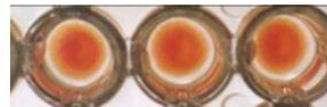
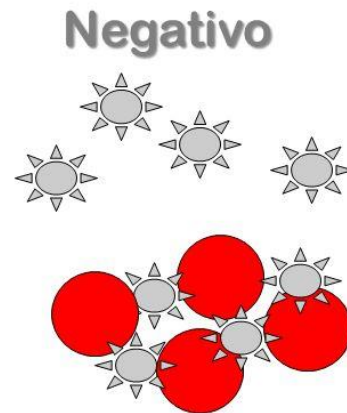
# Diagnóstico rápido



Inibição da Hemaglutinação:

- Capacidade de alguns vírus em aglutinar hemácias é bloqueada por anticorpos específicos contra determinado vírus → quantificação!
- Rápida, fácil execução, identifica exatamente um vírus;
- Restrito

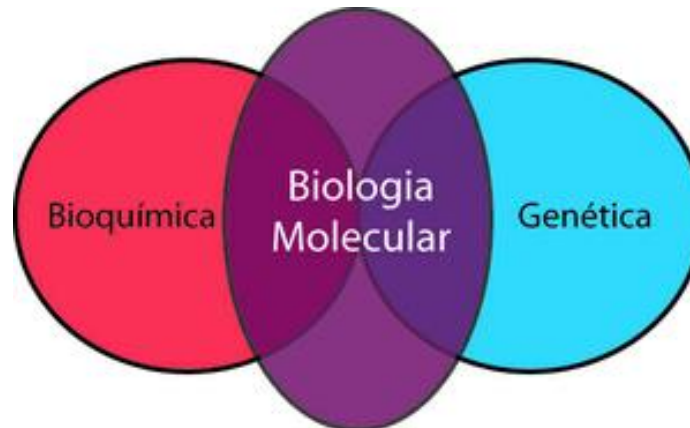
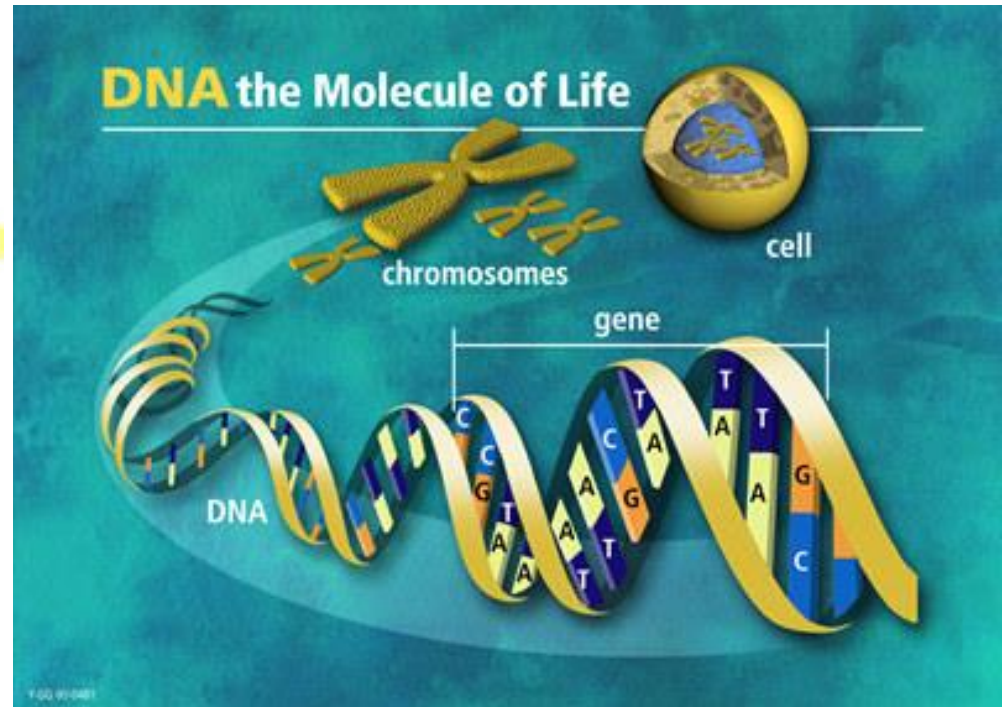
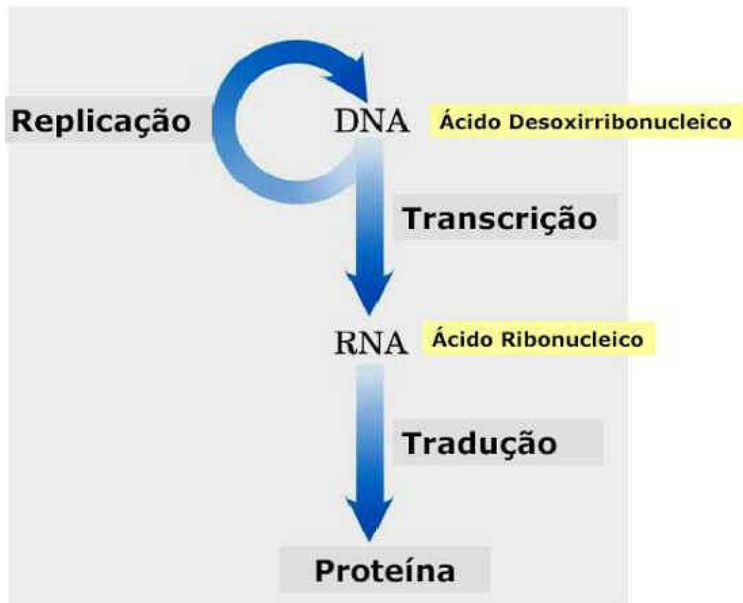
## Teste de inibição da Hemaglutinação Direta



# Técnicas Moleculares

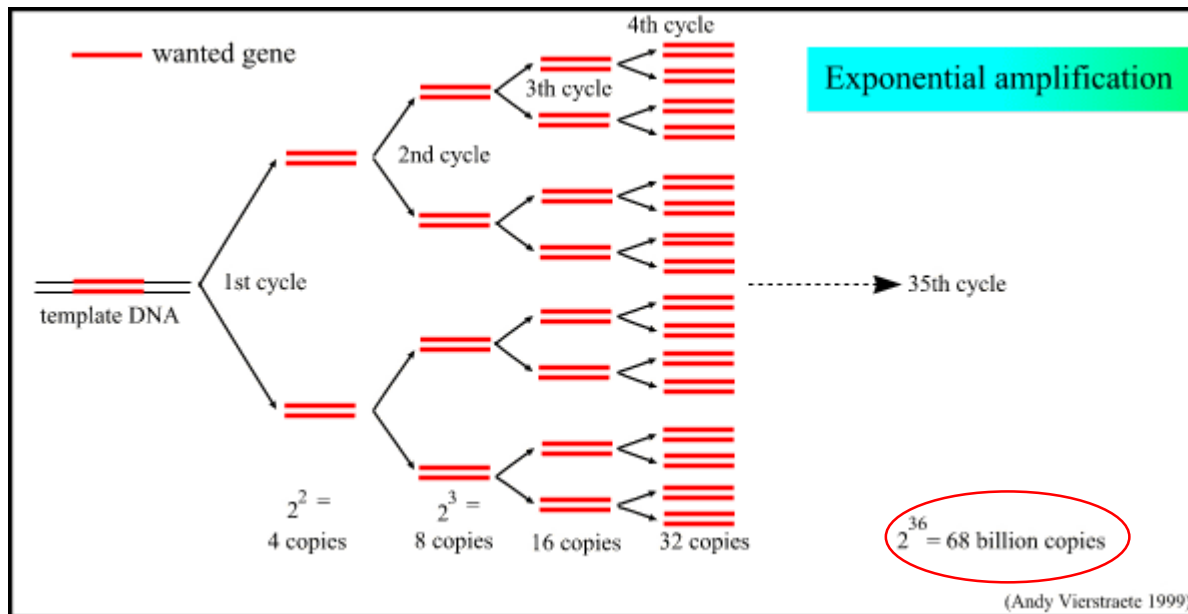


# Informação codificada para vida!



# Reação em cadeia da polimerase - PCR

Ampliar o número de determinada sequência de DNA

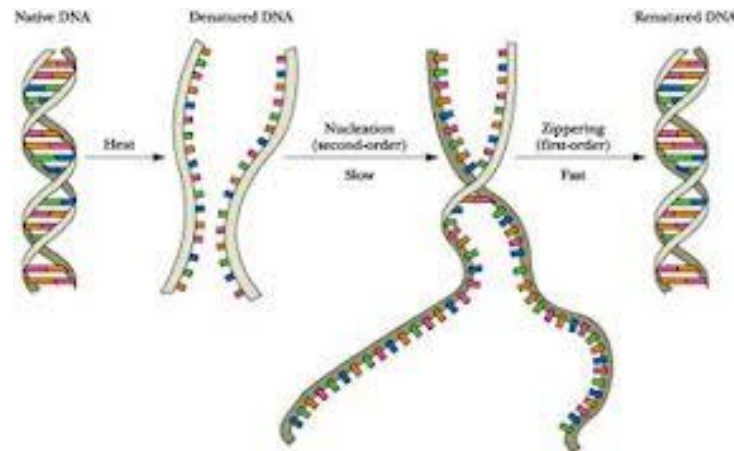


Mimetizando a duplicação *in vivo*!

# Reação em cadeia da polimerase - PCR

## *In vitro*

- Aquecimento – Resfriamento cíclico

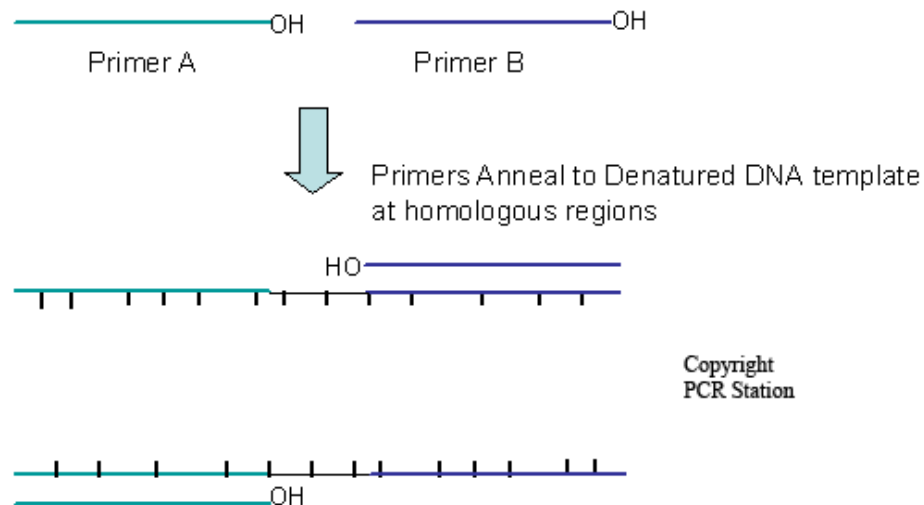


- Temperatura máxima  $\sim 100^{\circ}\text{C}$
- Temperatura de desnaturação  $\sim 95^{\circ}\text{C}$
- Temperatura ótima Taqpolimerase  $\sim 72^{\circ}\text{C}$
- Anelamento: variável

# Reação em cadeia da polimerase - PCR

## *In vitro*

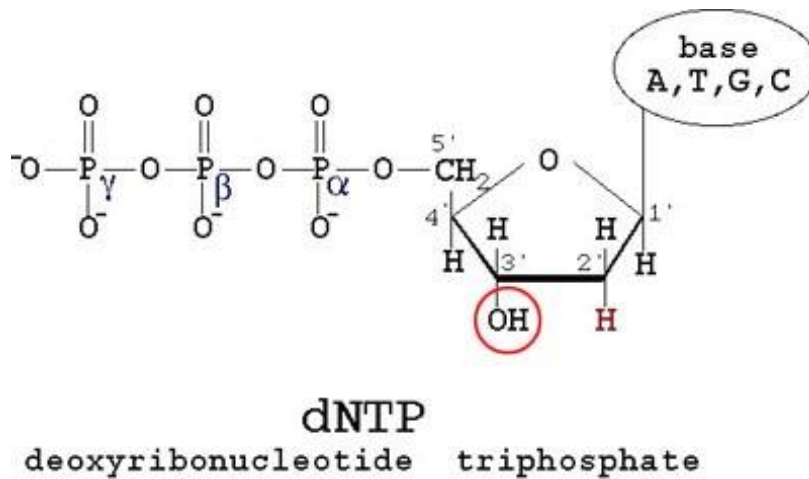
- Primers (iniciadores) DNA:
  - Senso e Anti-senso
  - Complementariedade à sequência alvo do gene: desenhados!
  - Permitem a ação da Taq



Copyright  
PCR Station

# Reação em cadeia da polimerase - PCR

*In vitro*



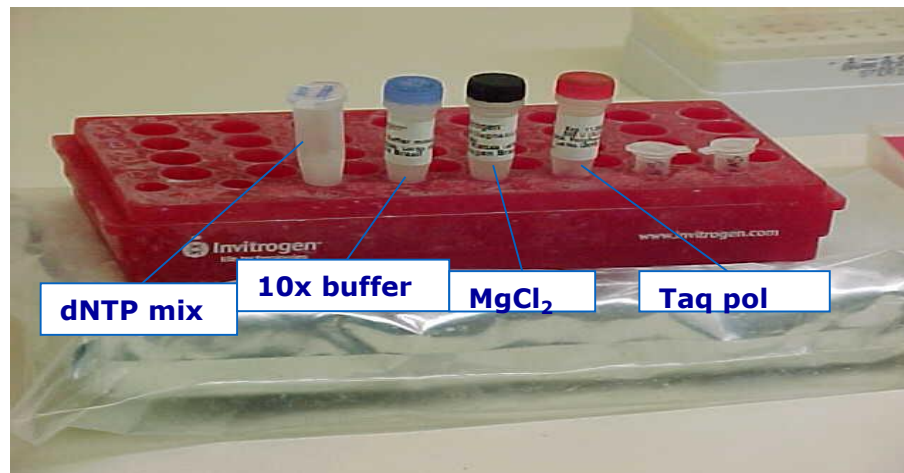
# Reação em cadeia da polimerase - PCR

## *In vitro*

**Água** autoclavada e deionizada: completa o volume final da reação

**Tampão 10X concentrado:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0 , 50mM KCl ⇒ mantém o pH ótimo para a reação

**Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ ):** otimiza a atividade da Taq polimerase. Concentração: 0,5 a 2,5 mM

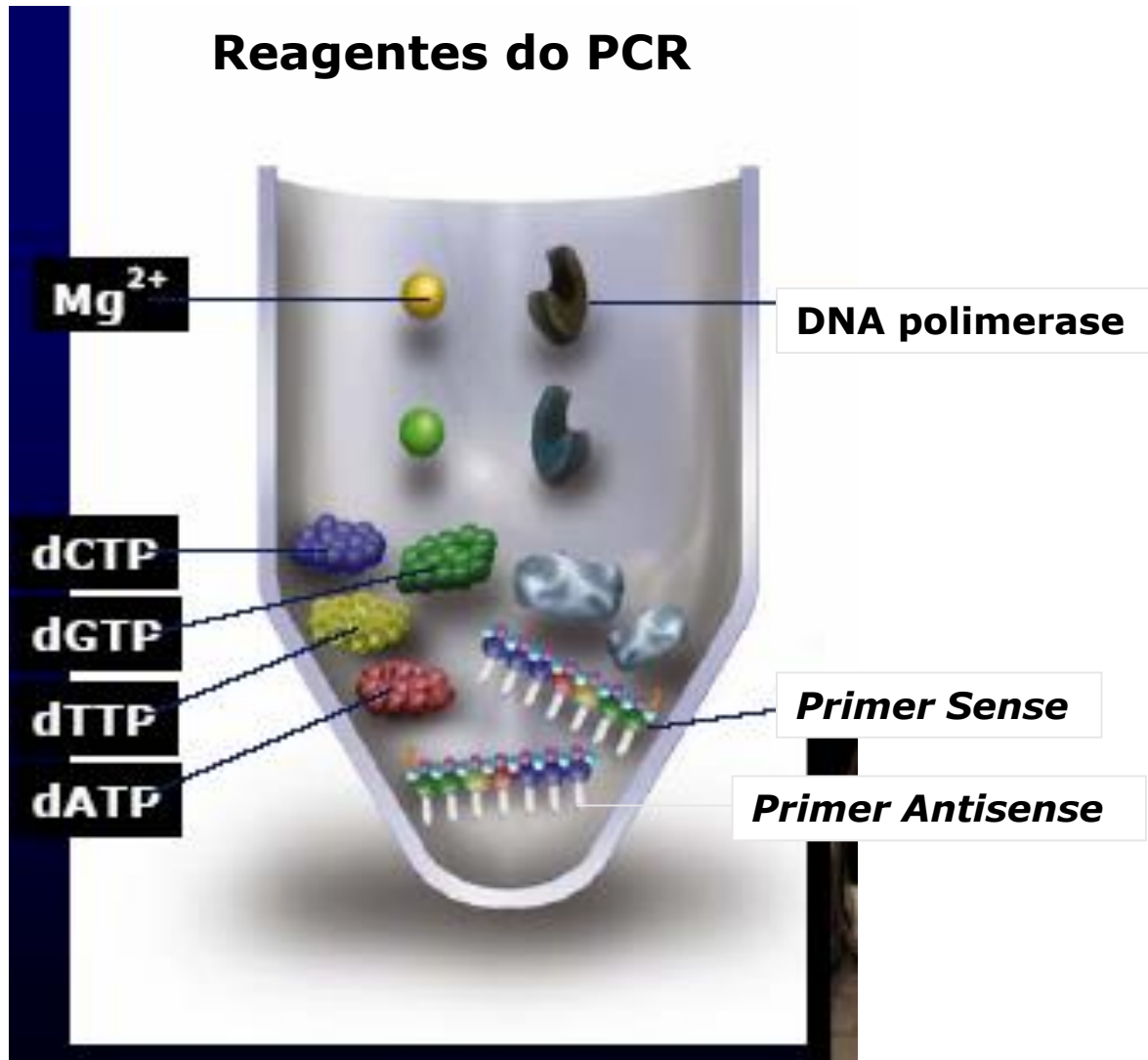




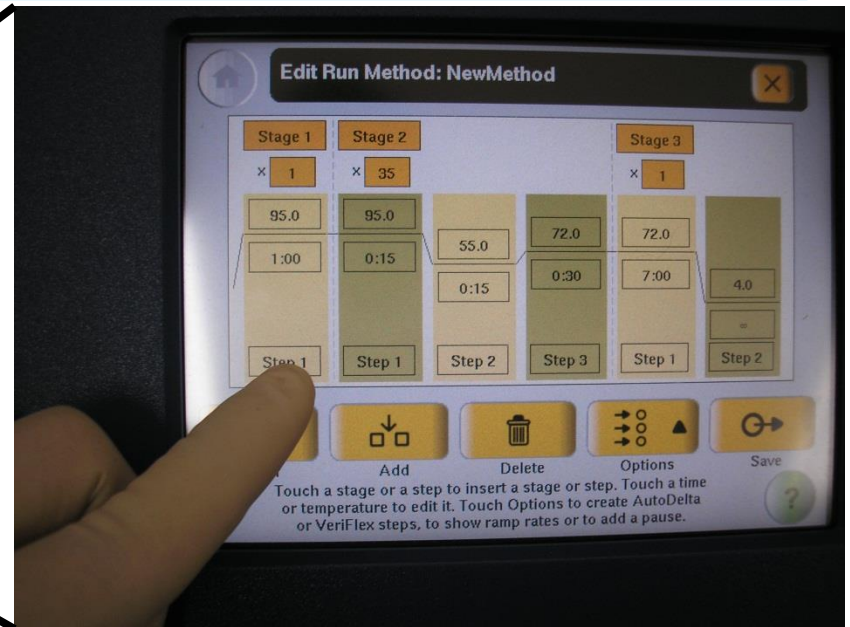
# Reação em cadeia da polimerase - PCR



## Reagentes do PCR



# Reação em cadeia da polimerase - PCR



**Desnaturação Inicial**  
**95° 10'**

**Ciclagem (30 – 40x)**  
**Desnaturação do DNA (95°C – 30'' a 1')**  
**Temperatura de anelamento variável**  
**Extensão 72°C (30'' a 1')**

**Extensão Final**  
**72°C 7'**

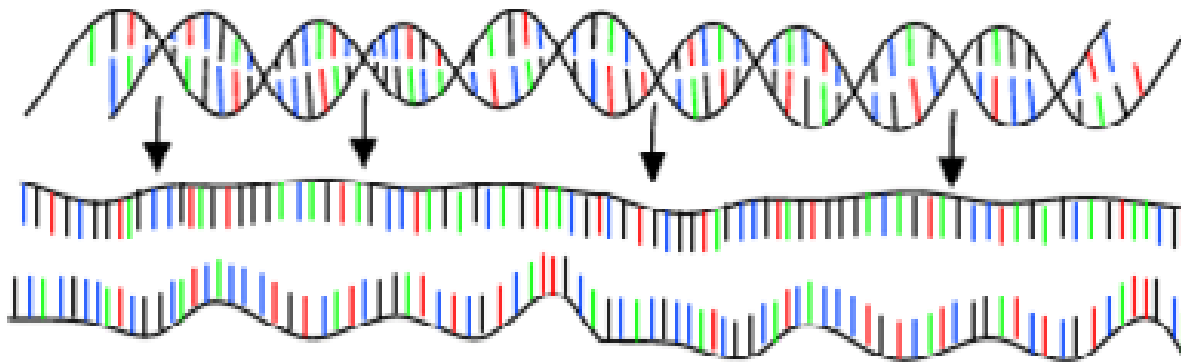
Temperatura de anelamento  $\sim 5^{\circ}\text{C}$  abaixo da  $T_m$  (*melting Temperature*) do primer;

Para calcular  $T_m$  de um *primer* :  $2 (A + T) + 4 (G + C)$

# Reação em cadeia da polimerase - PCR

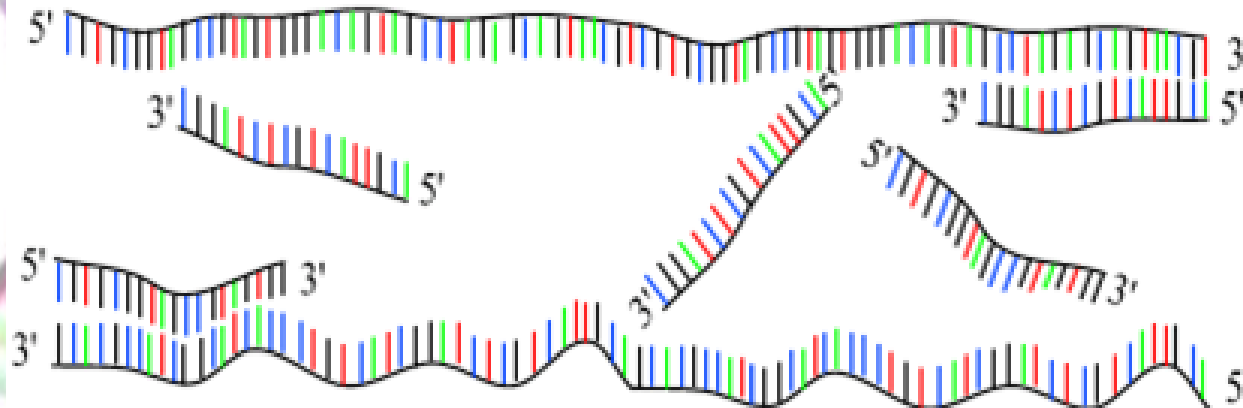
Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C



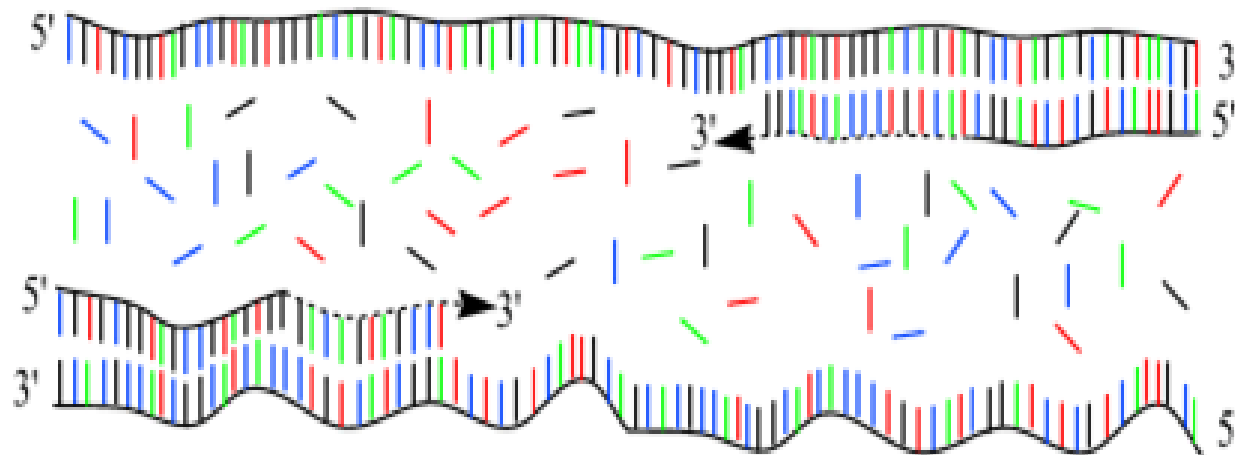
Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C



forward and reverse primers !!!

# Reação em cadeia da polimerase - PCR



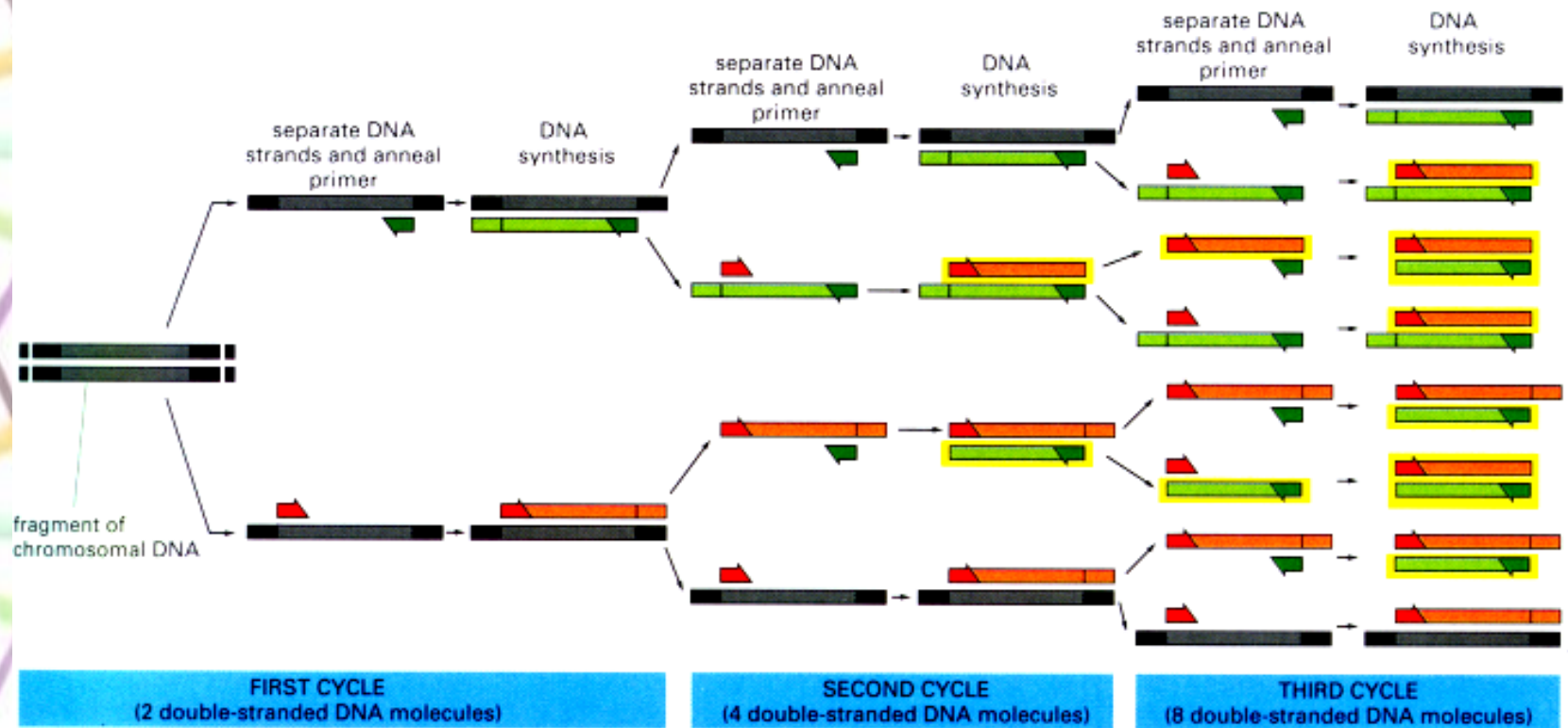
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C  
only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

- 35 a 100 nuc/seg
- 1 minuto = 1,2kbp

# Reação em cadeia da polimerase - PCR



DNA?? CADÊ???

# Eletroforese

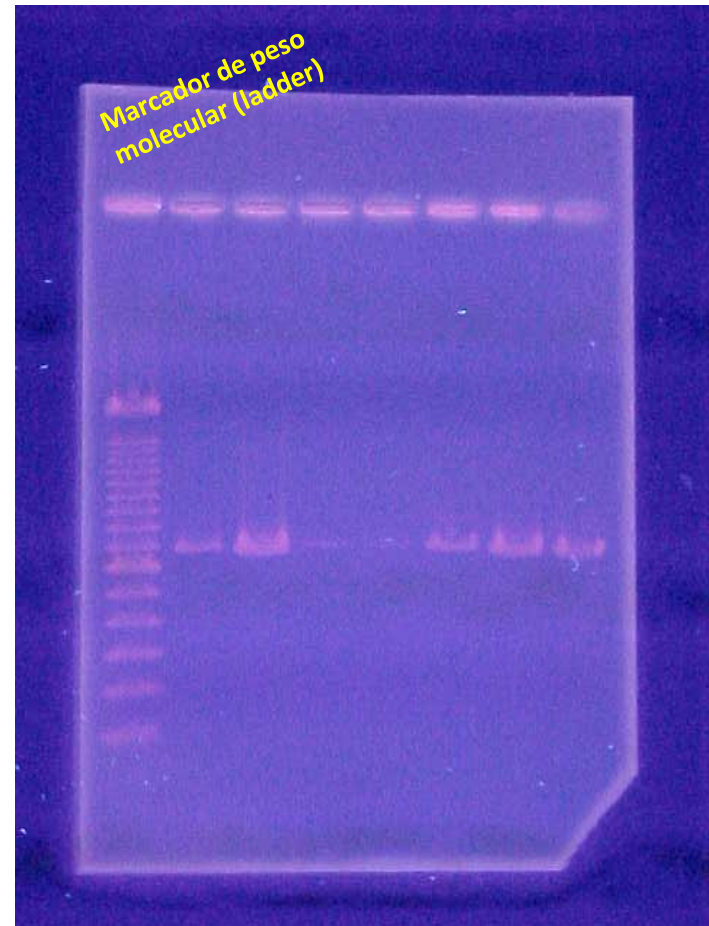
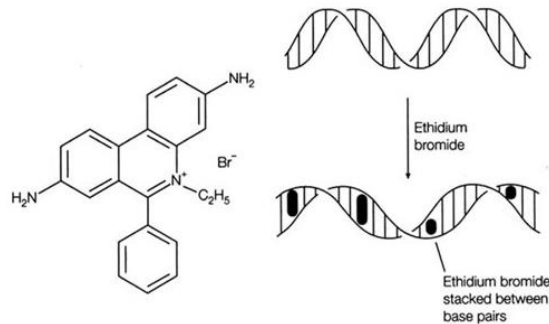
- Agarose ou Poliacrilamida



A separação é feita por peso molecular de casa amostra que migra no gel devido a corrente elétrica

# Eletroforese - visualização

O Brometo de Etídio -intercalante de DNA- fluoresce em UV



# Variações do PCR: Nested

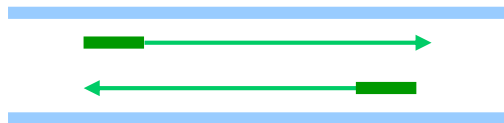
Nested PCR pode ser uma alternativa para melhorar a especificidade e a sensibilidade da PCR



1º PCR: *primers externos*



Produto do 1º PCR :  
*template* para o 2º PCR



2º PCR: *primers internos*



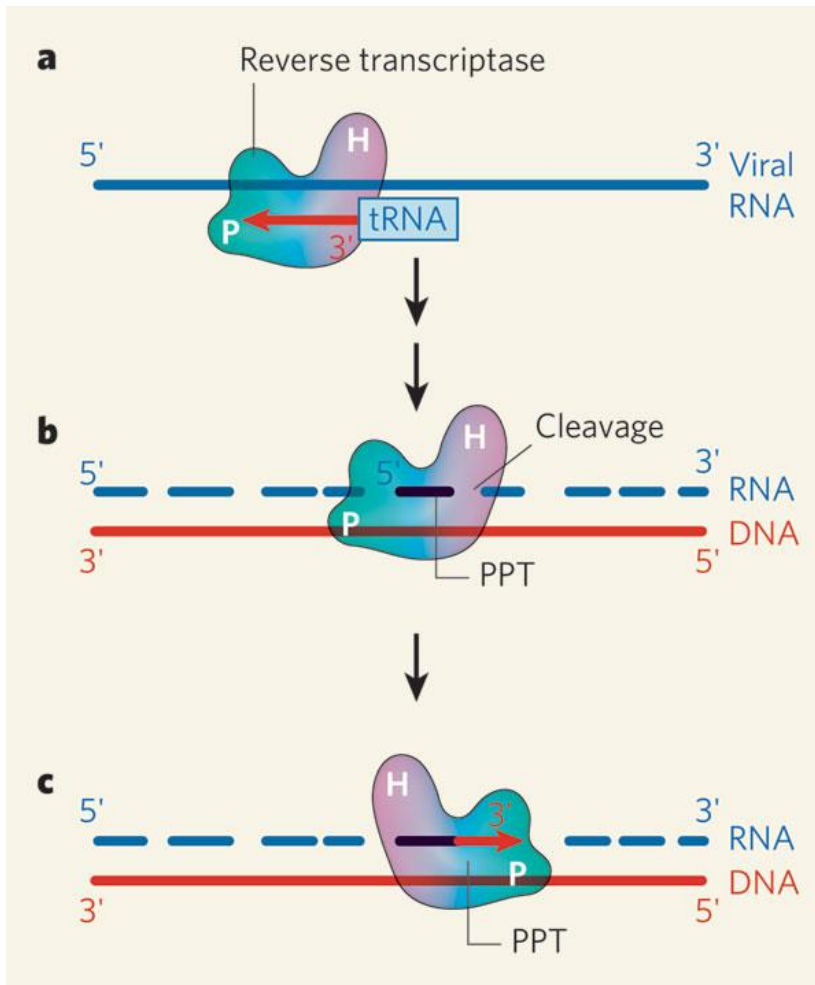
Produto do 2º PCR





# Variações do PCR: RT-PCR

- Para vírus de genoma RNA, pesquisa de RNAm



-Realização da reação de transcrição reversa -> Transcriptase Reversa

-Cuidados a tomar durante o preparo do c-DNA



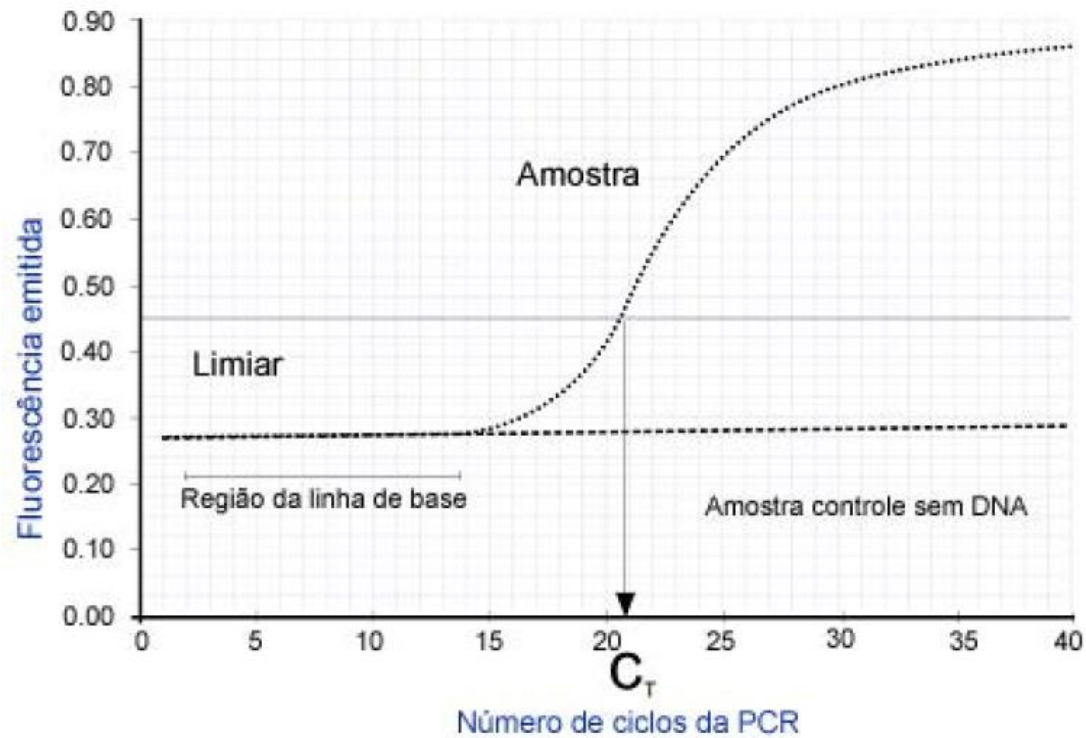
# Variações do PCR: PCR em tempo real

**Ensaio quantitativo, rápido, dispensa  
realização do gel**

**Baseado na emissão de fluorescência e detecção  
por Laser**

- TaqMan
- Syber Green
- Molecular beacon

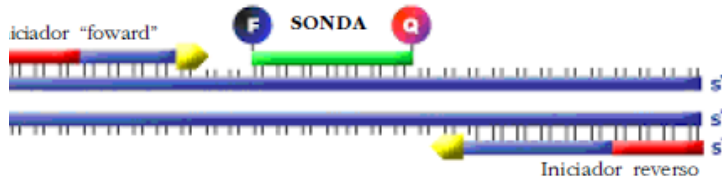
# PCR em Tempo Real



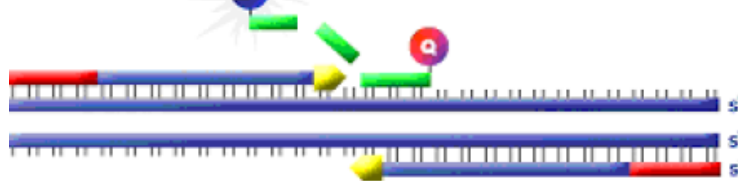
Novaes et al 2004

# TaqMan

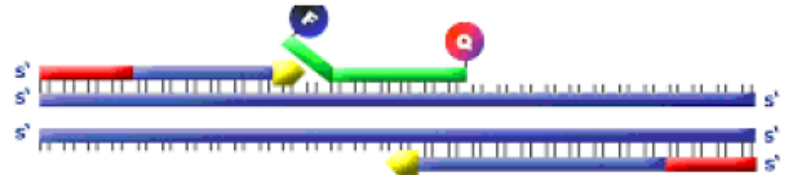
## 1. Limerização



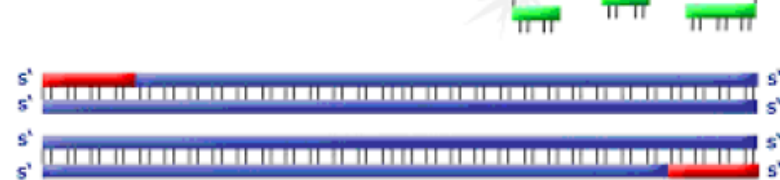
## 2. Divisão



## 3. Substituição da fita

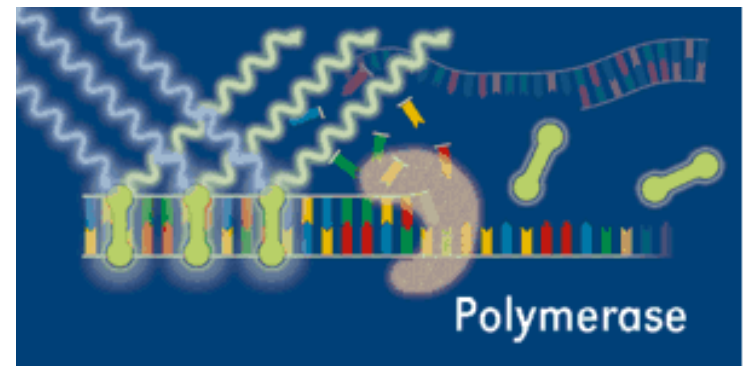
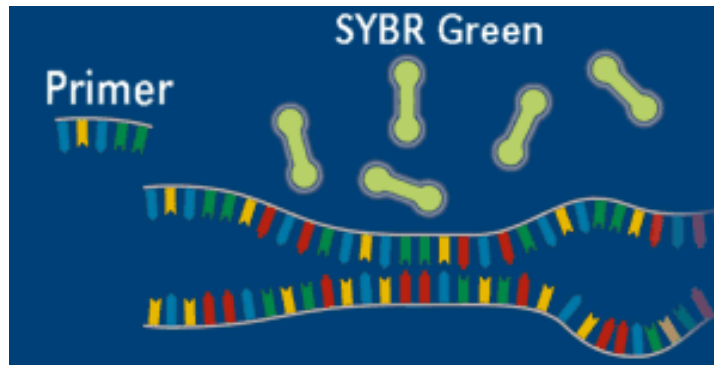
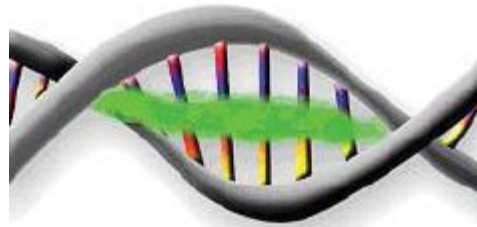


## 4. Polimerização finalizada



**F** = Fluoróforo  
**Q** = Quencher

# Sybr Green®

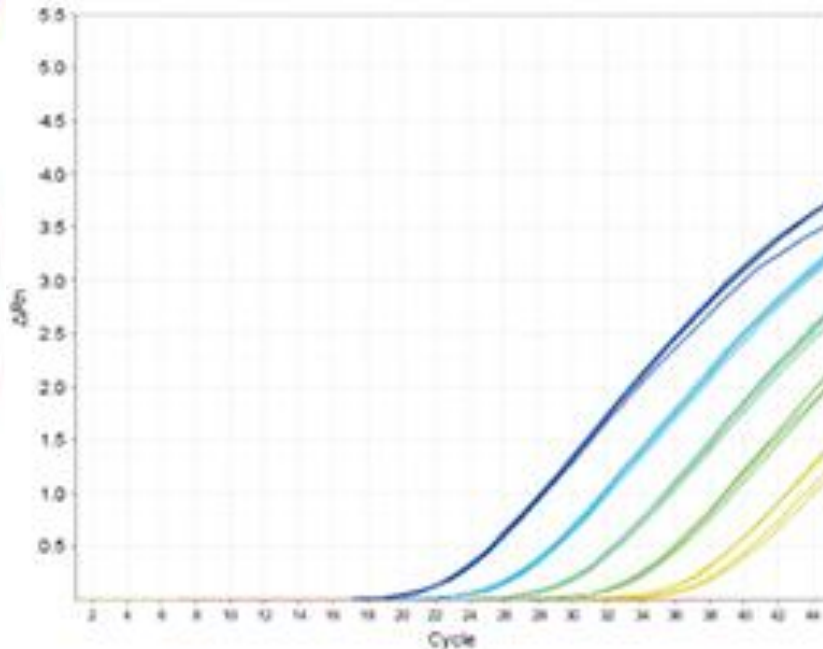


Novaes et al 2004

# PCR em Tempo Real

**Quantificação: Curva de calibração a partir de concentrações conhecidas de DNA**

Amplification Plot



Representação de um plot da amplificação em tempo real: 3 fases

- linha basal: não houve clivagem suficiente do corante-repórter para que se possa detectar a fluorescência
- fase log: a quantidade de amplicon dobra a cada ciclo
- fase platô: não há mais aumento no número de ampliconsxx