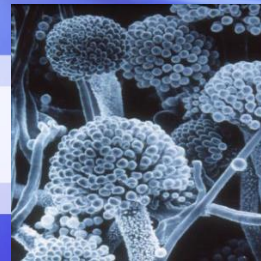
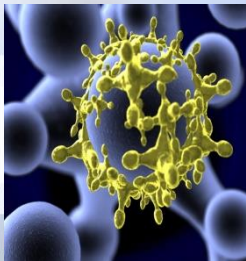


Diagnóstico das infecções virais

Tatiana Castro

Departamento de Microbiologia e Parasitologia- UFF



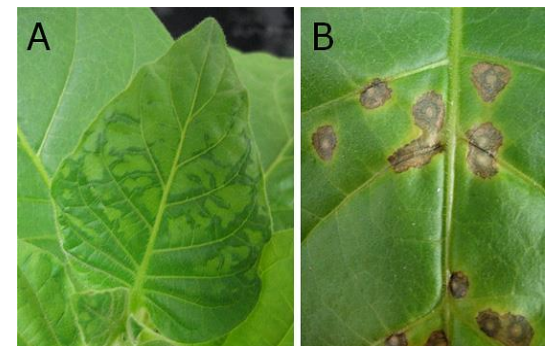
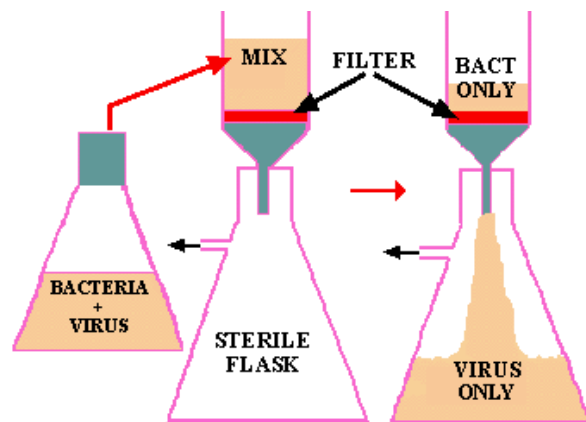
Histórico

1882: Meyer- Detecção de partículas não filtráveis

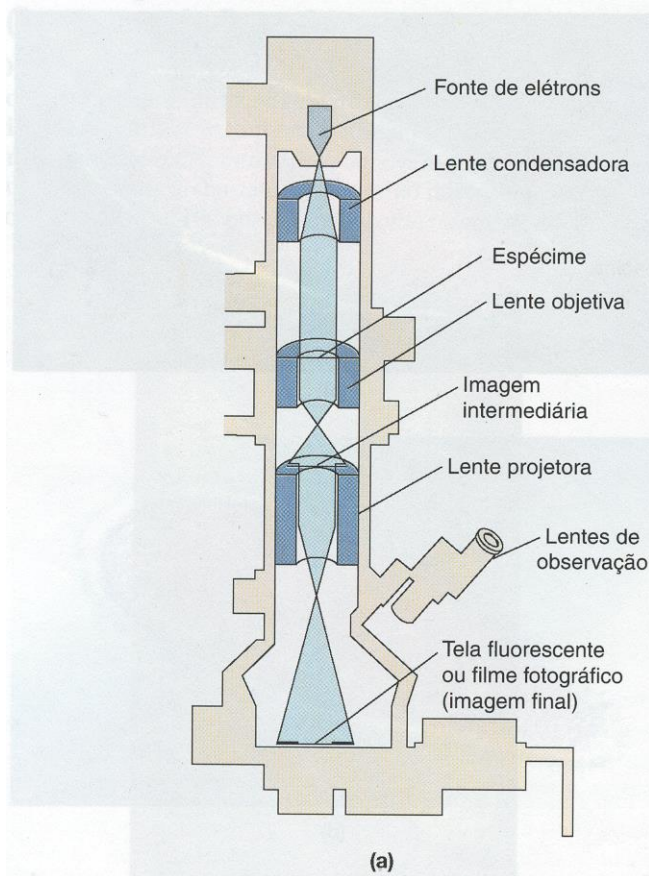
"Vírus do mosaico do tabaco"

Filtrabilidade dos vírus: *material filtrado continha um veneno ou um agente desconhecido tão pequeno que era capaz de atravessar os poros de um filtro que retinha bactéria*

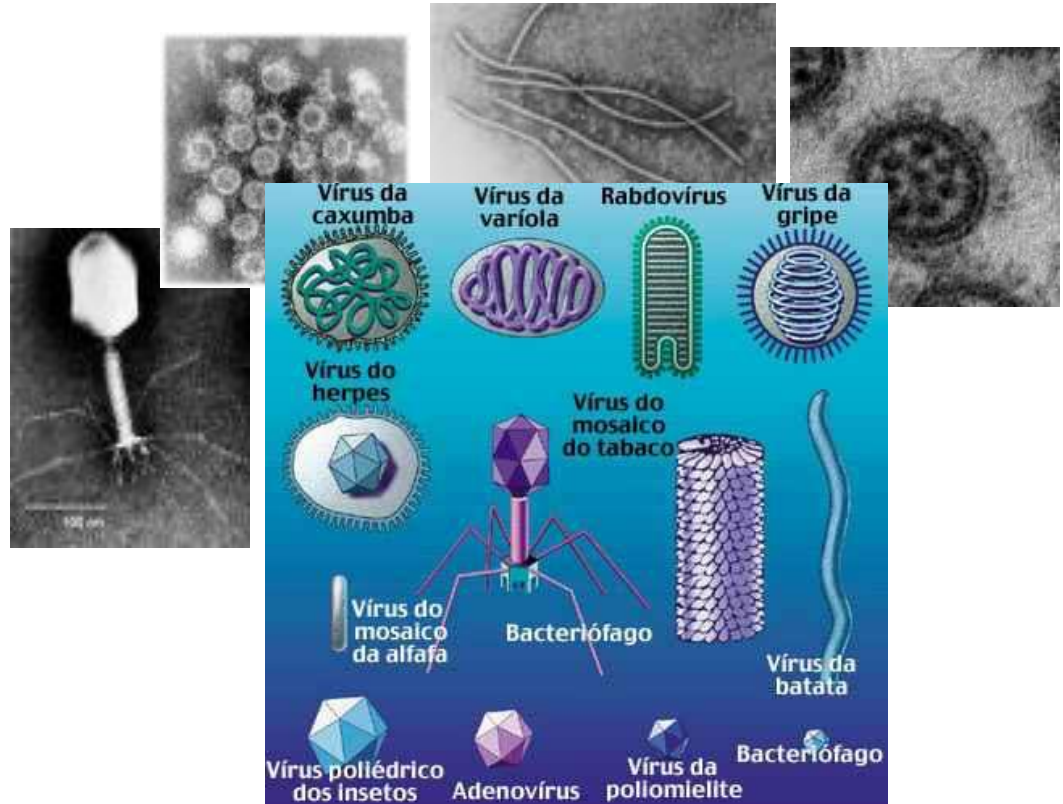
Vírus = Veneno



Histórico



Microscópio eletrônico



1937: Felix d'Herrelle ⇒ Microscopia eletrônica

bacteriófagos : agentes sólidos

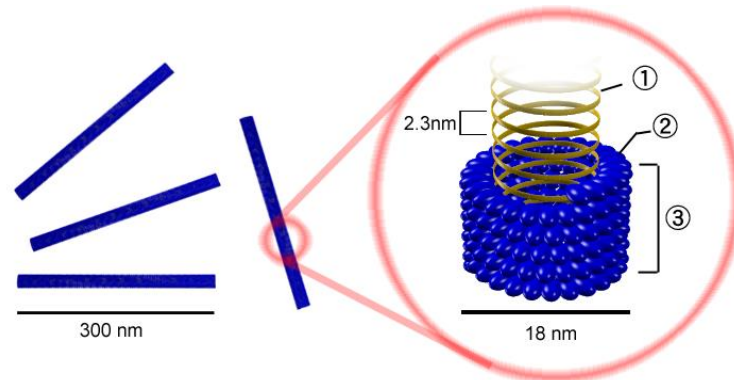
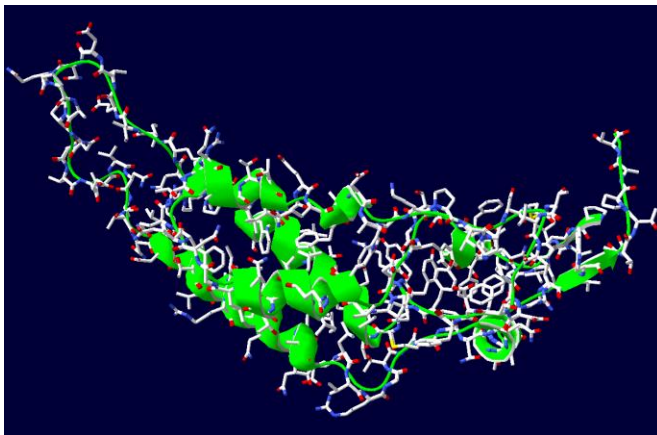
Histórico

1953: W M Stanley et al. cristalizou o vírus do mosaico do tabaco

Evidência de estrutura e composição química

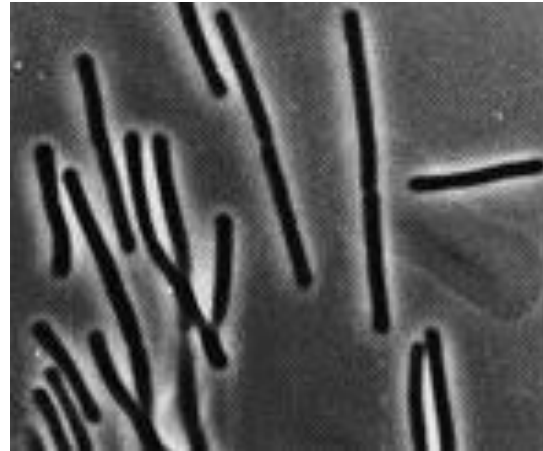
1950-1960: Necessidade de classificação e nomenclatura universal

Vírus \Rightarrow ácido nucleico (DNA ou RNA) + proteínas



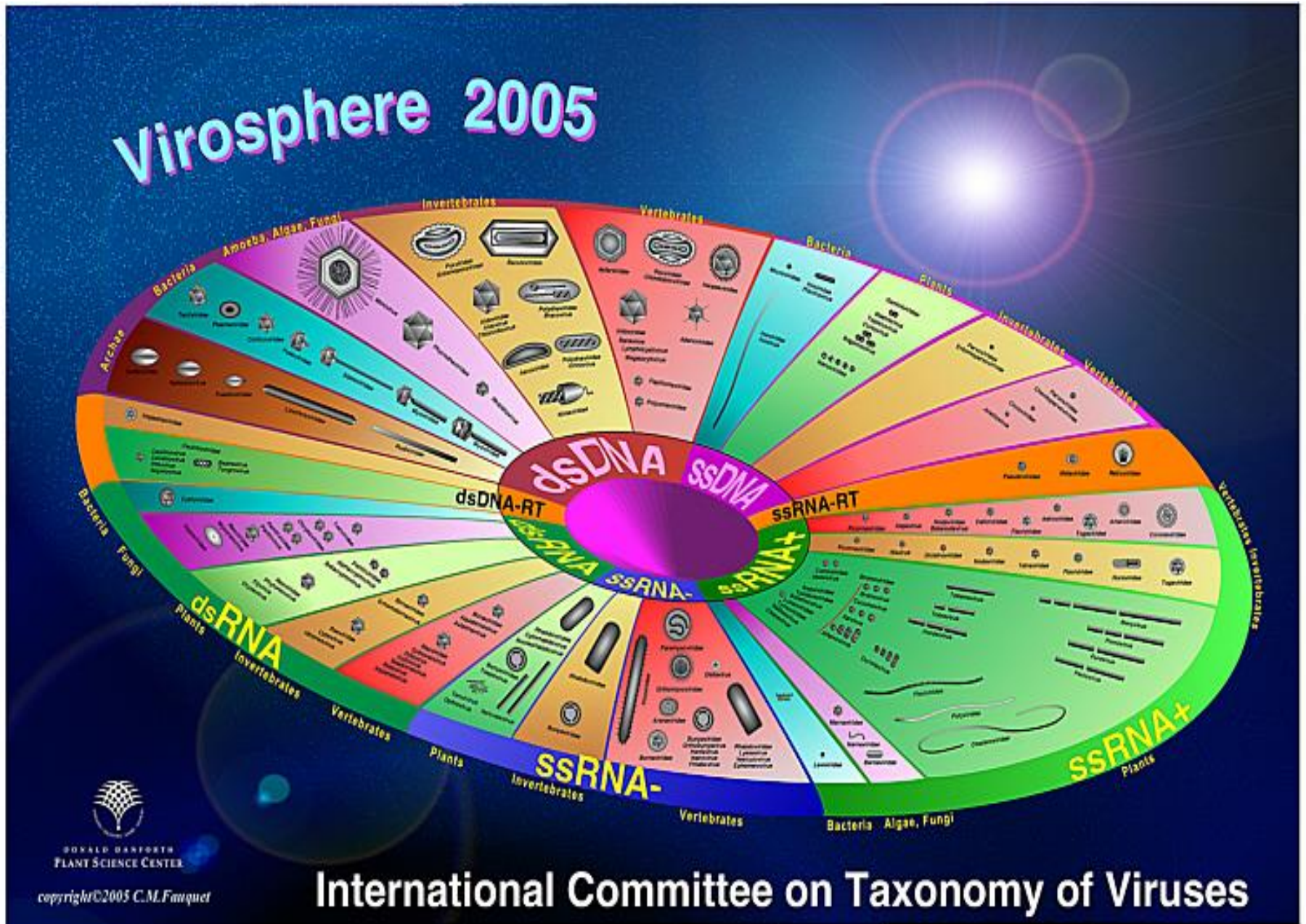
upload.wikimedia.org

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)



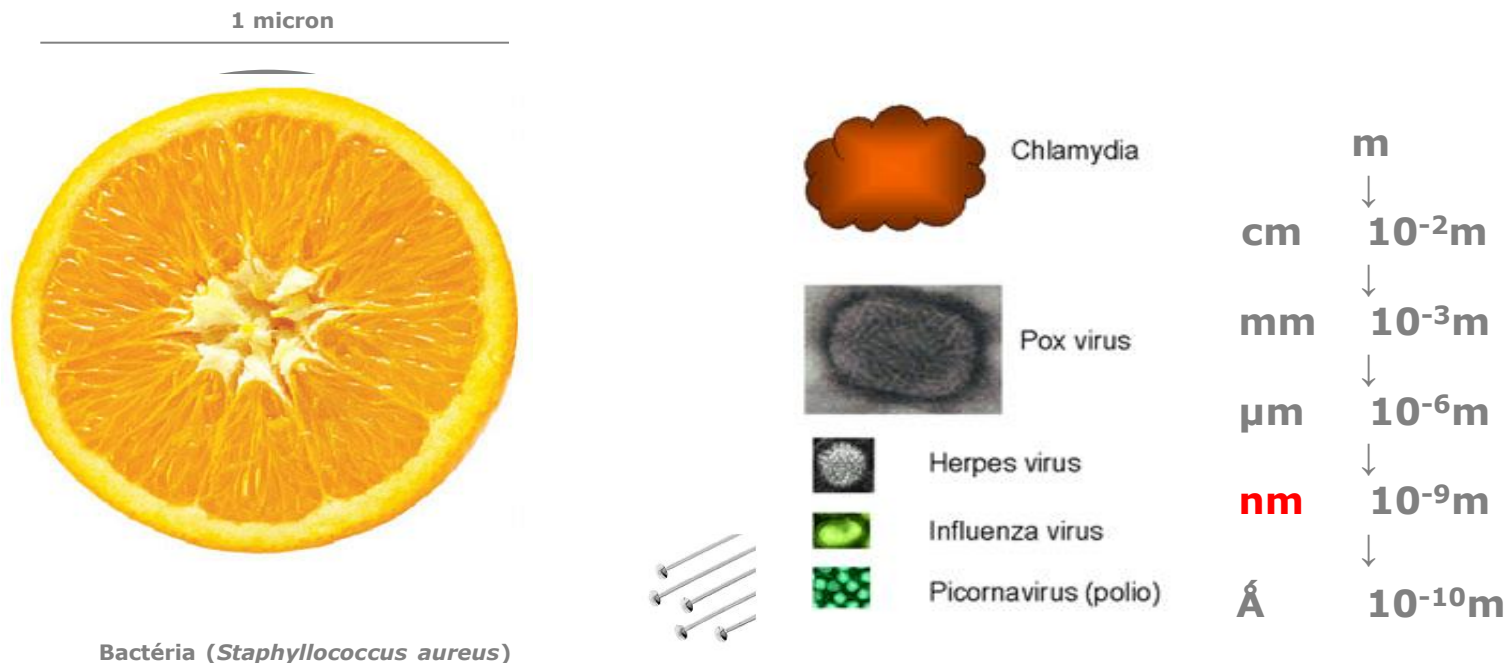
- **Taq polimerase:** DNA polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, que vive em água com temperatura de 75°C.
- **Karys Muller:** Primeira descrição da PCR no final da década de 80
- Em **1989** o processo foi patenteado
- **Nobel de Química** em 1993
- Usado rotineiramente nos laboratórios de investigação médica e biológica

Classificação dos Vírus (ICTV)

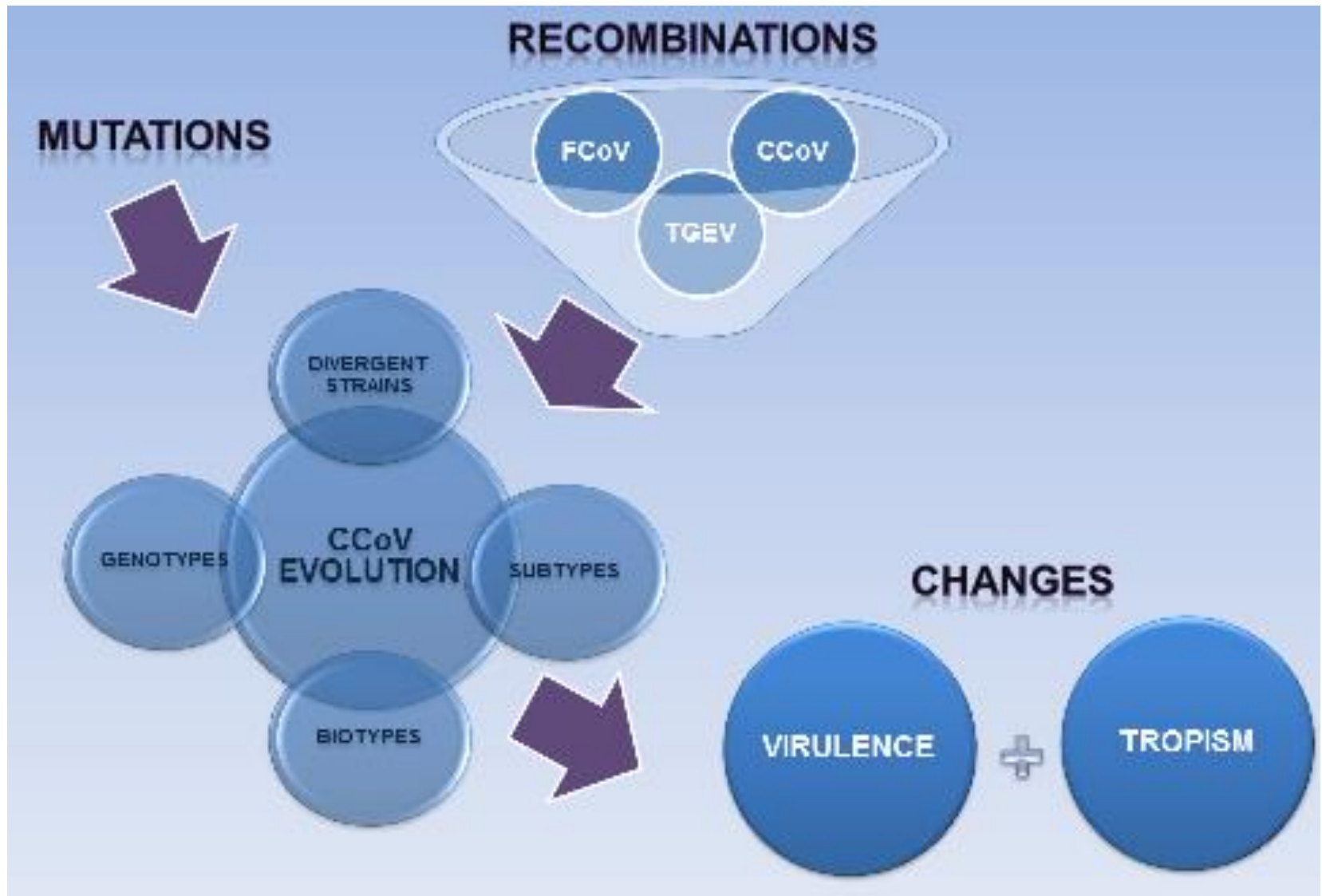


Características dos vírus

- Extremamente pequenos, não visualizados em microscopia ótica
- Parasitas Intracelulares obrigatórios, necessitando de metabolismo celular ativo para replicação
- Possuem uma única espécie de ácido nucléico: DNA ou RNA



Variabilidade genética



Amostra Clínica

Infecção respiratória: aspirado de nasofaringe,
swab de garganta

Infecção entérica: Fezes

Pele: líquido da vesícula, biópsia

Urina

Infecção no SNC: líquido, 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)

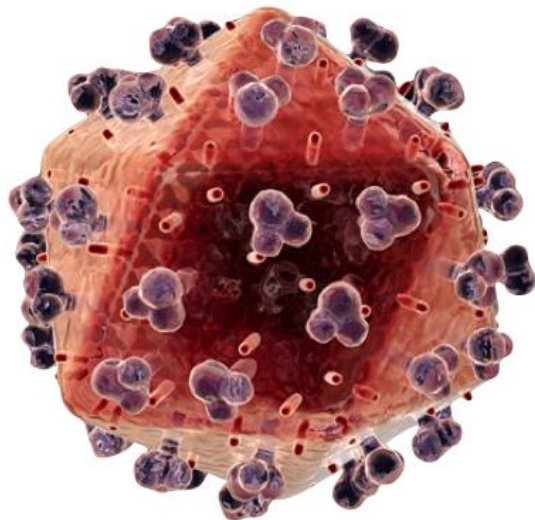
Imunofluorescência (IF)

Ensaio imunoenzimático (EIE)

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

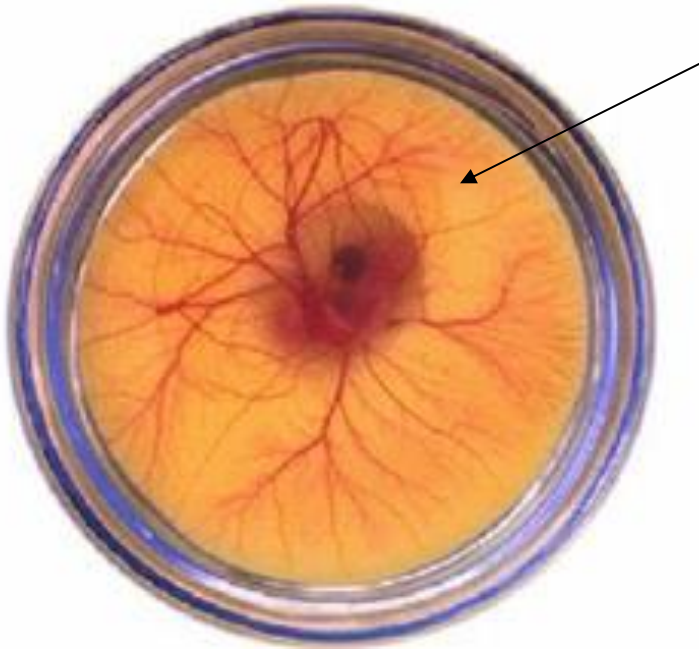


INOCULAÇÃO EM OVO EMBRIONADO

- **Embrião em desenvolvimento: ideal para multiplicação de vírus**
- **Requisitos**
 - **Livres de contaminação**
 - **Viabilidade**
 - **Idade ideal**
- **Vantagens: Sensibilidade, facilidade de realização**
- **Desvantagens: contaminações, morte embrionária**



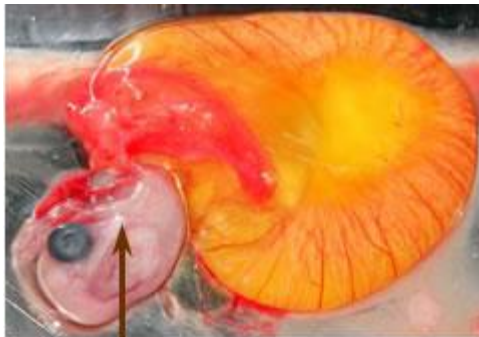
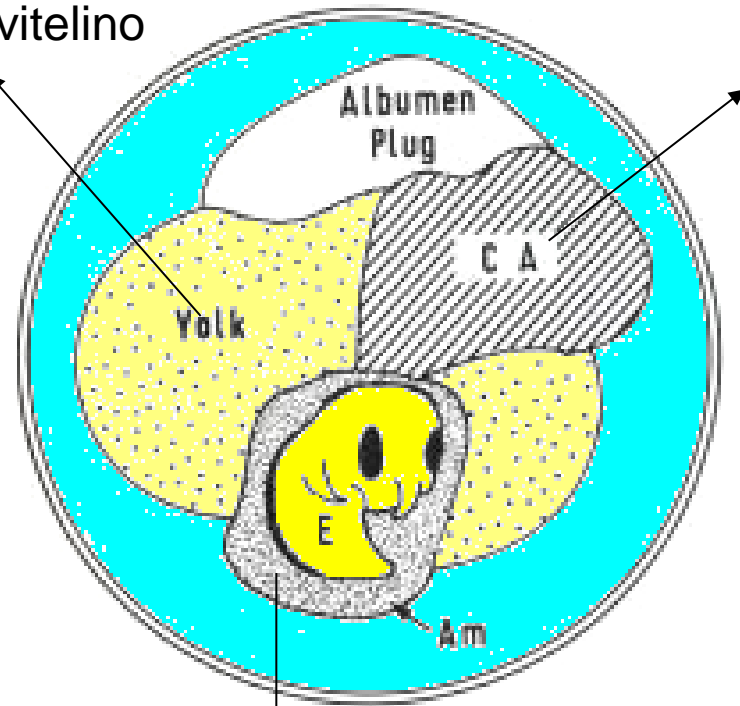
Anatomia dos ovos embrionados



Membrana corioalantóica

Cav. alantóica

Saco vitelino



Embrião

Cav. amniótica

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.

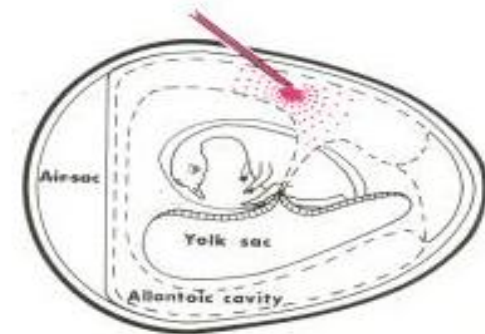


FIG. 46

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**;



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.*)

Cultura de células

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

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



Cultura de células



Tecido



Desagregação do tecido original

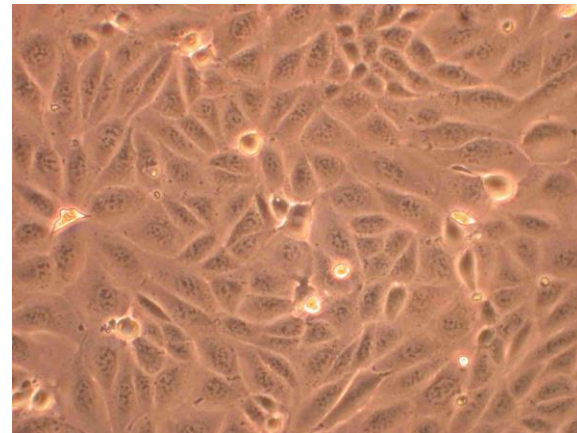
(Dissociação Mecânica e
Enzimática Tripsina + EDTA)



Filtração



Cultura primária



Cultura de células

Meio Mínimo Essencial (MME)

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

Condições Ambientais

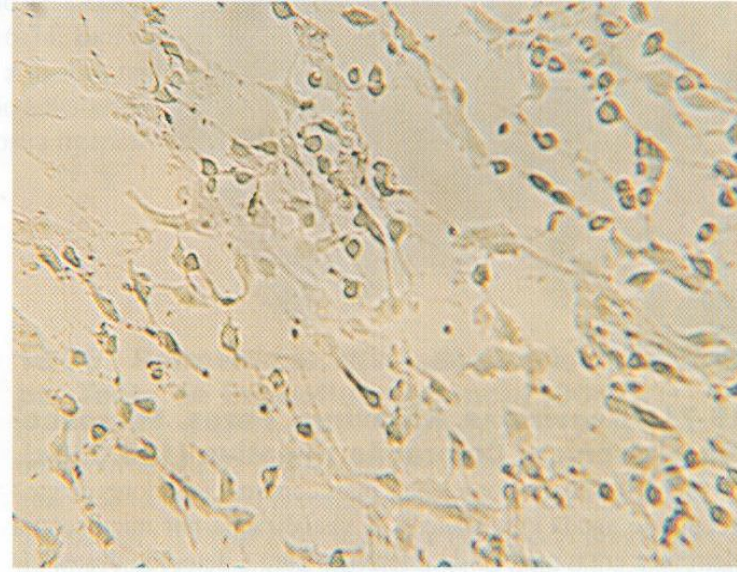
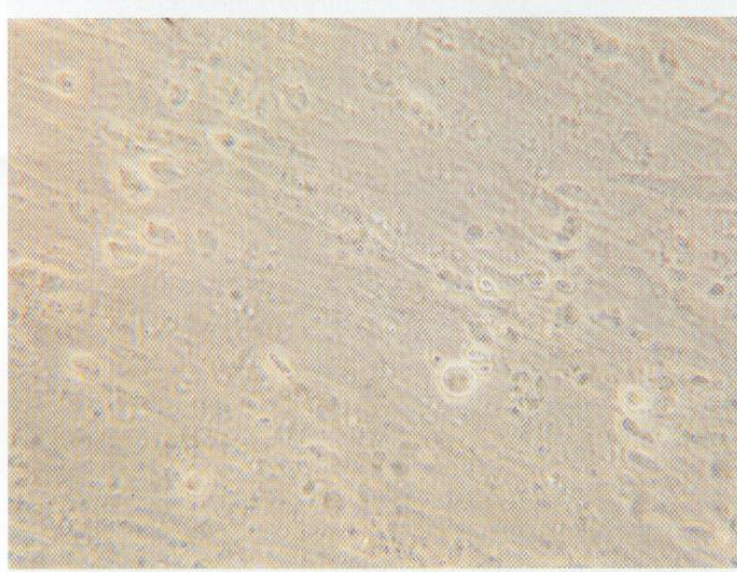
- Temperatura (37°C)
- Umidade
- Níveis de CO_2
- pH (7.2)



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

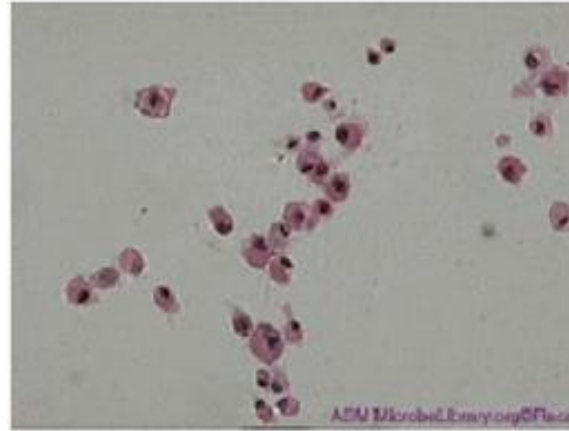
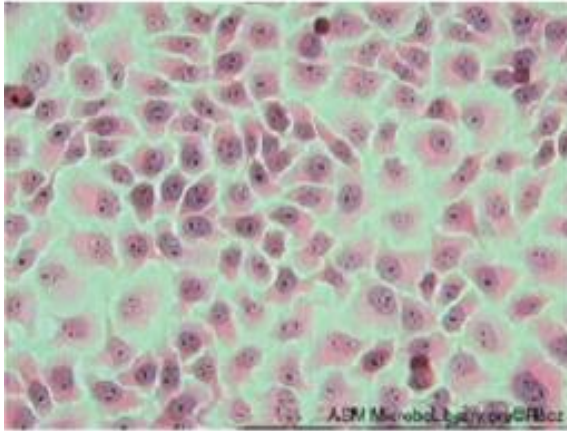
Efeito citopático

Picornavírus em cultivo celular

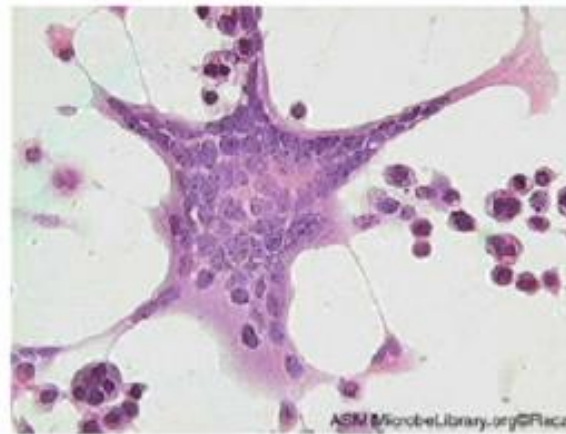
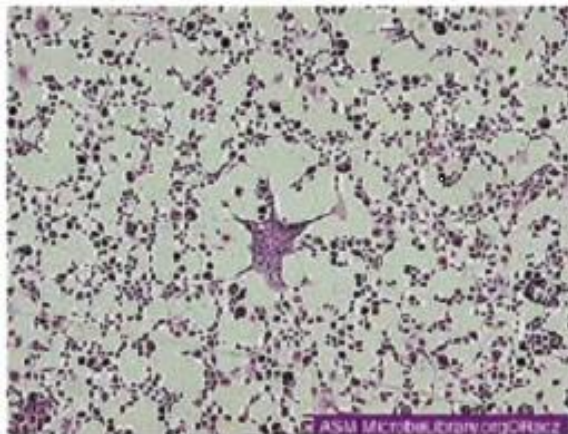


Efeitos da replicação viral nas células hospedeiras (vírus citopáticos – ECP)

Células Vero infectadas com Poliovírus.



Células Vero infectadas com Herpesvirus.



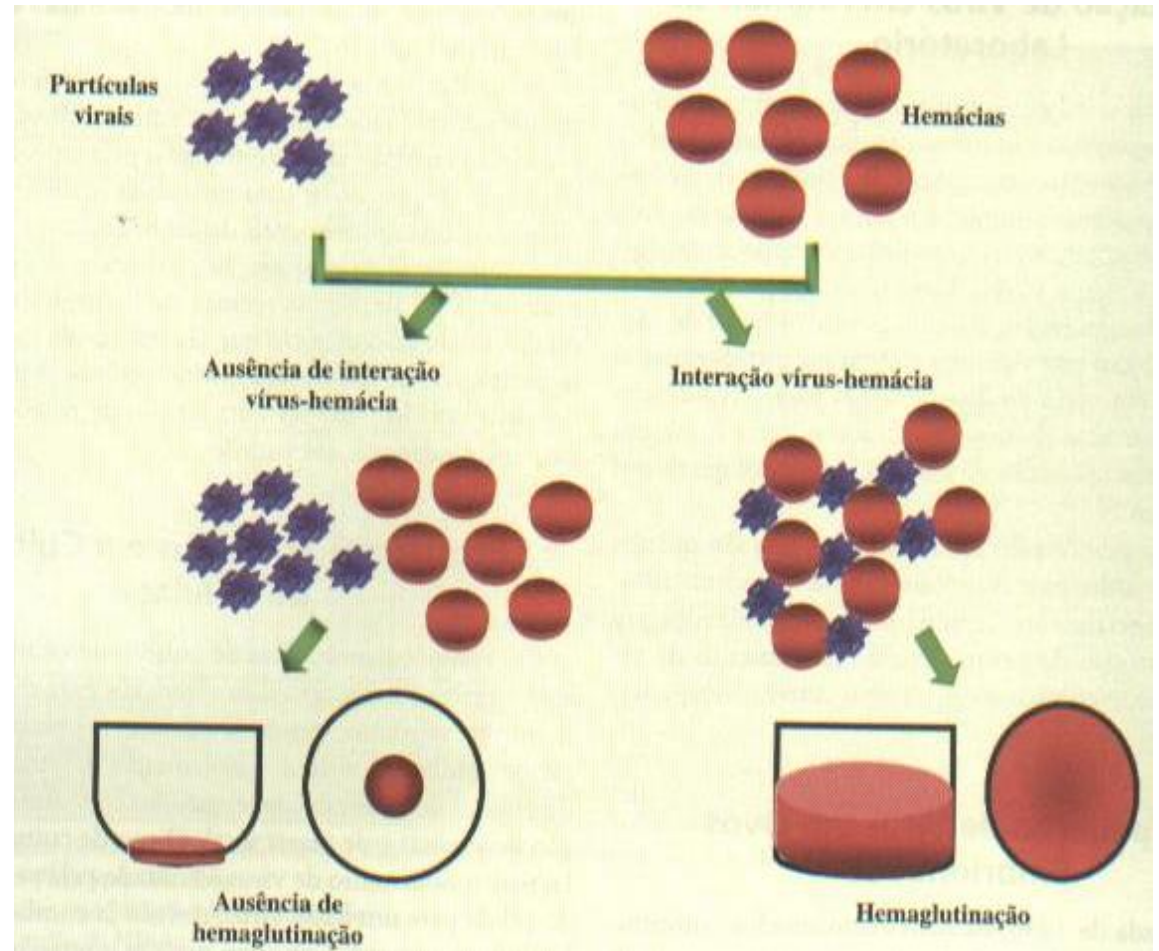
Identificação

- 1) Reação de Imunofluorescência
- 2) Ensaio imunoenzimático
- 3) Reação de Hemaglutinação
- 4) PCR

Identificação

Reação de Hemaglutinação

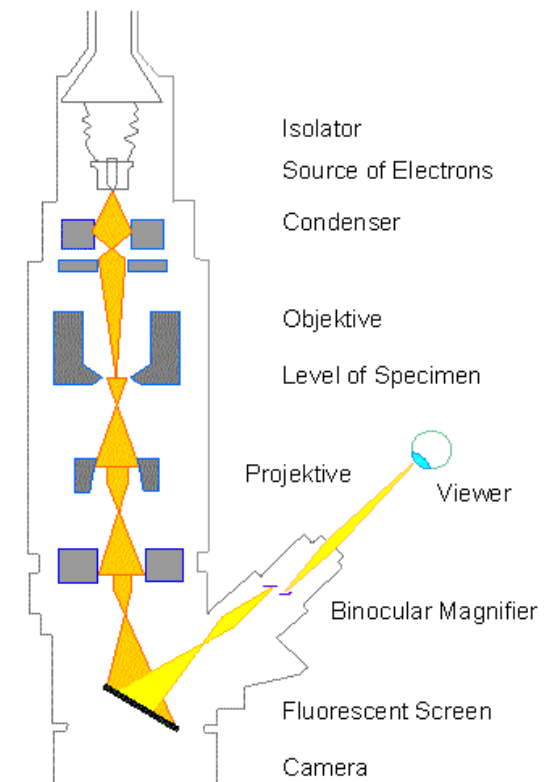
Os vírus se ligam às hemácias aglutinando-as



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.

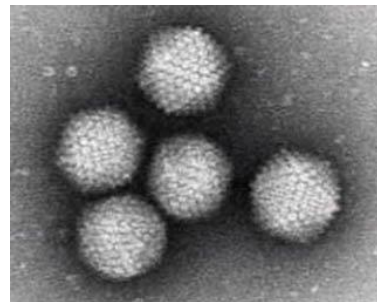


Microscopia eletrônica

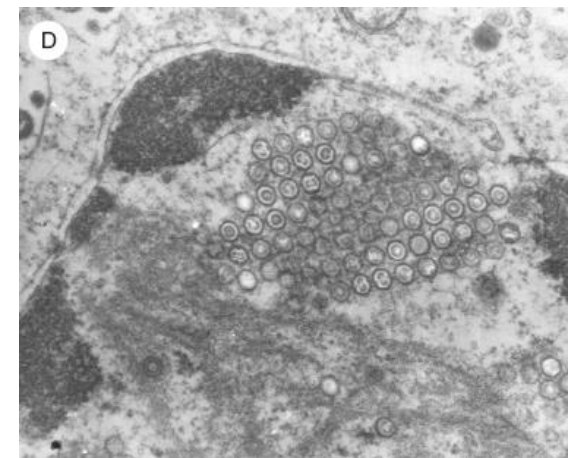
- Rápida identificação de vírus
- Baixa sensibilidade (10^6 - 10^7 partículas / mL).
- Aumento da sensibilidade: imunoeletromicroscopia, ultracentrifugação, anticorpos marcados com partículas de ouro (*imunogold*).



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

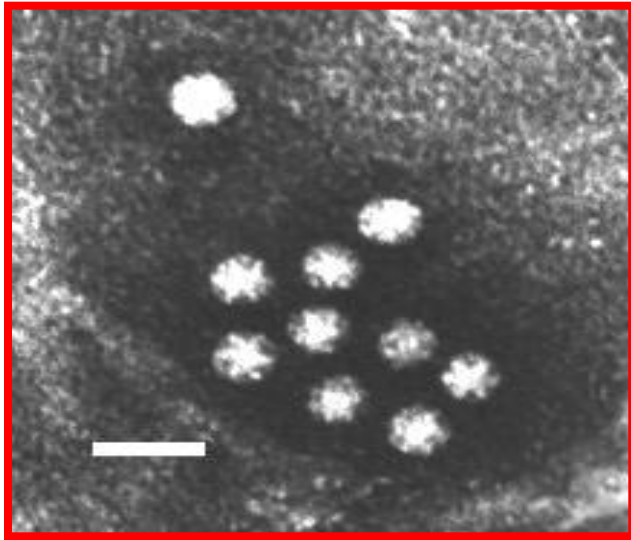


M.E: Adenovírus

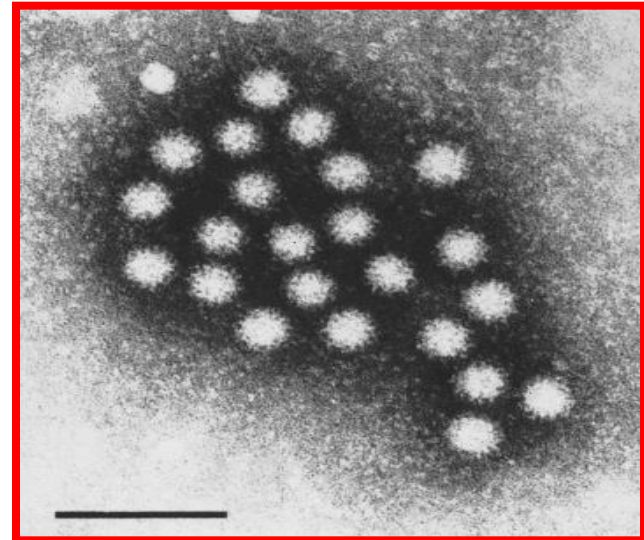


M.E: Herpesvírus
em células de cultivo

Diagnóstico laboratorial de vírus associados à gastroenterite



??



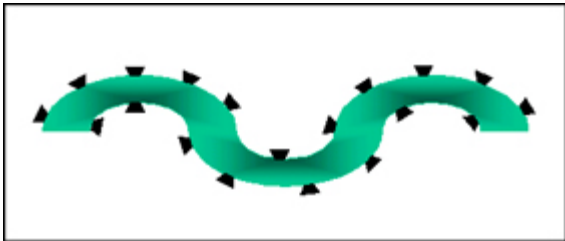
Detecção do antígeno viral

Antígeno

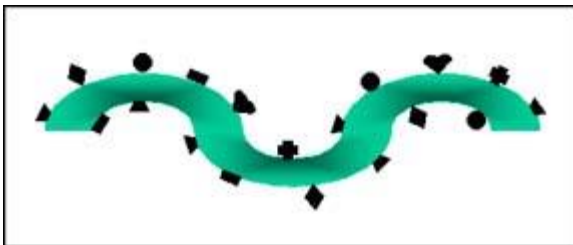
Antígeno: substância que reage com o produto da resposta imune específica

Imunógeno: substância que induz uma resposta imune

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



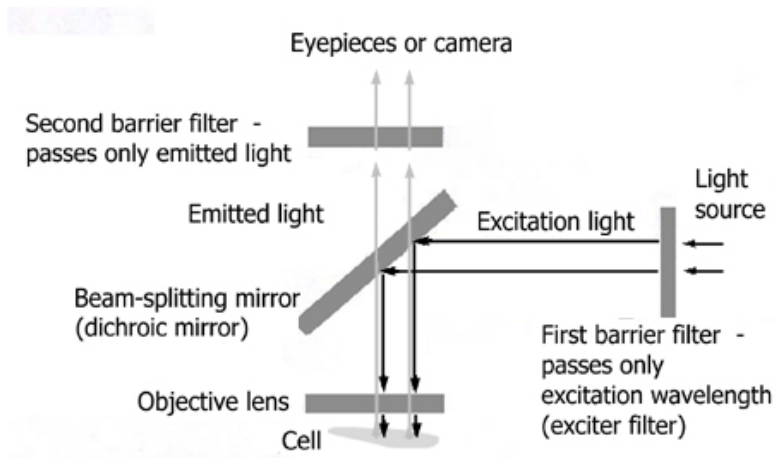
Ag com mesmo determinante antigênico repetido muitas vezes



Ag com determinantes antigênicos diferentes

Métodos rápidos: Imunofluorescência (IF)

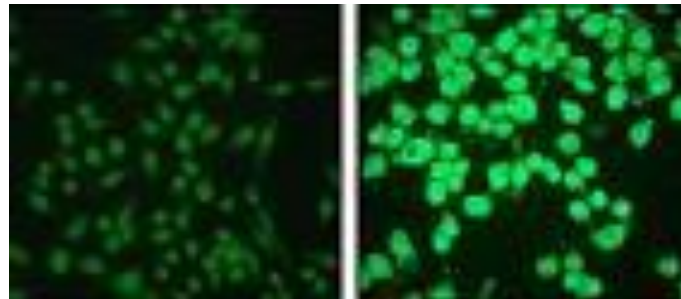
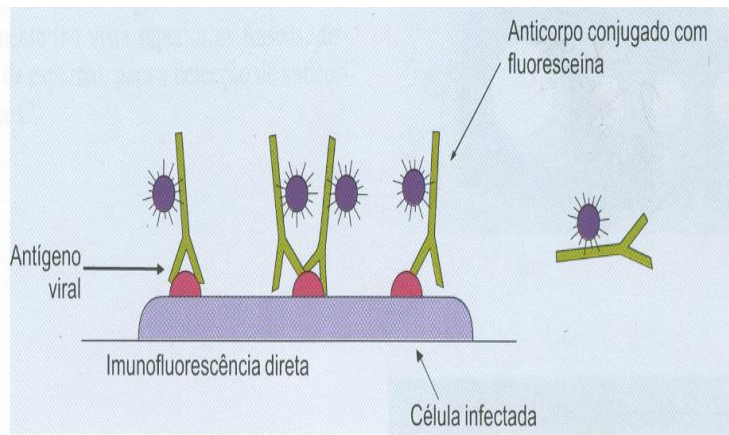
- Substâncias capazes de armazenar energia luminosa e liberá-la mais tarde: isotiocianato de fluoresceína, **rodamina**.



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).**



Aplicações para a Imunofluorescência direta

Diagnóstico da infecção pelo vírus da Raiva



MATERIAL: Encéfalo de animais suspeitos
Eqüinos: encéfalo e fragmentos de medula

- § **Imunofluorescência direta (IFD) em tecido cerebral**
- § **Prova biológica (Inoculação em camundongo neonato)**
- § **Histopatologia – corpúsculos de Negri**
- § **PCR**

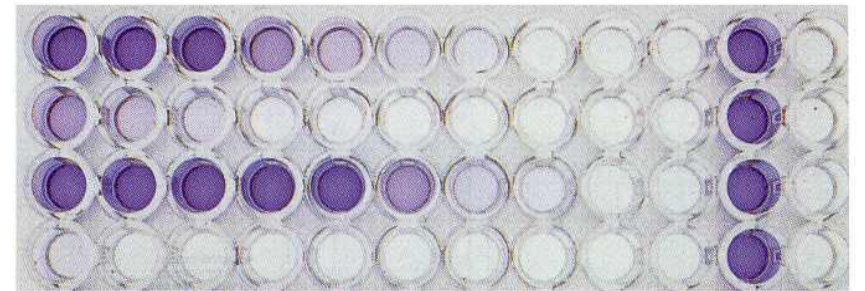
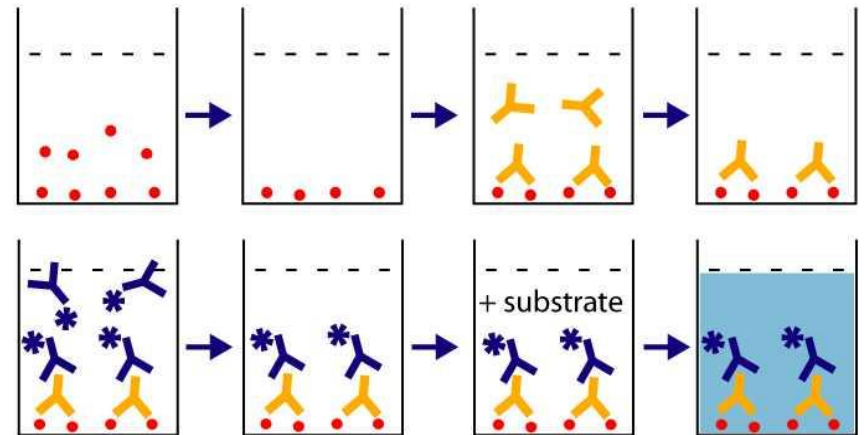


Métodos rápidos

Reações Imunológicas:

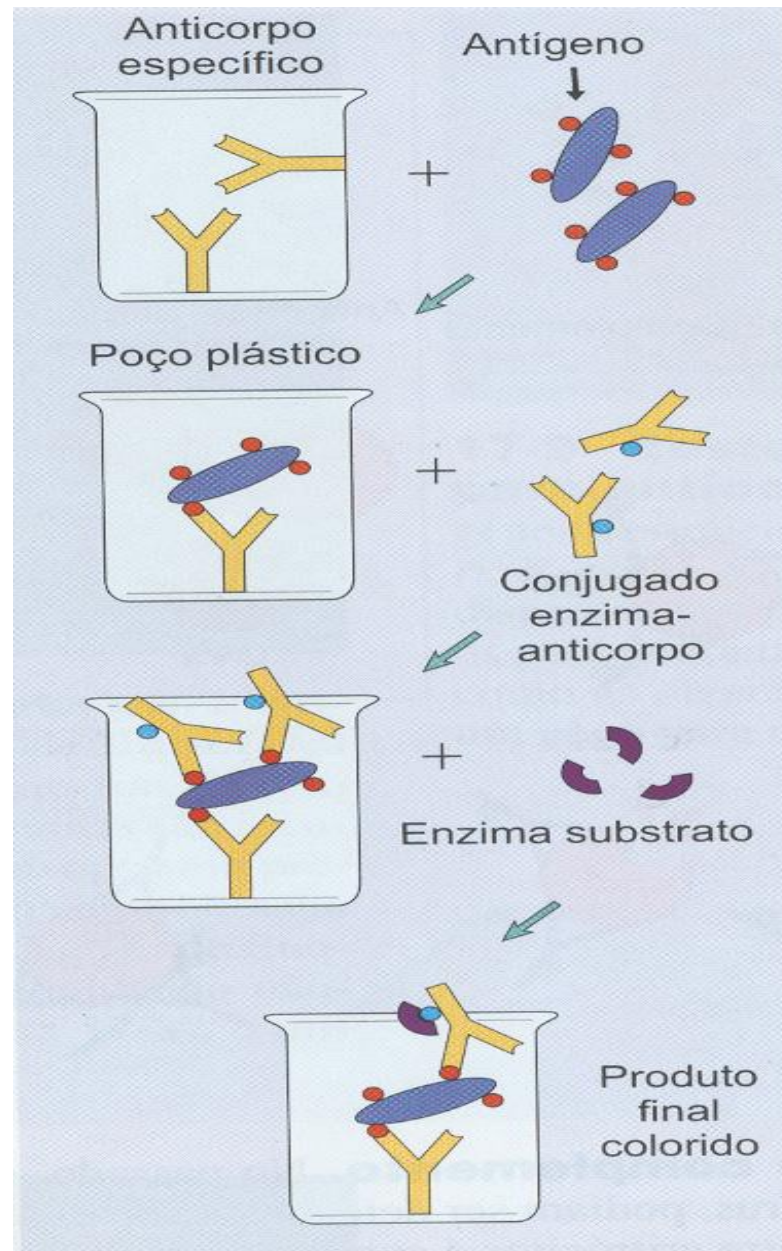
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) :

- **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.



Ensaio Imunoenzimático (EIE): pesquisa de Ag

(a) Sensibilização da microplaca ⇒
Ac de captura



(b) **Amostra
clínica**

(c) **conjugado**

(d) **substrato**

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 $DO > \text{cut-off} \Rightarrow$ positivas

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

Teste imunocromatográfico (kit-*snap**)

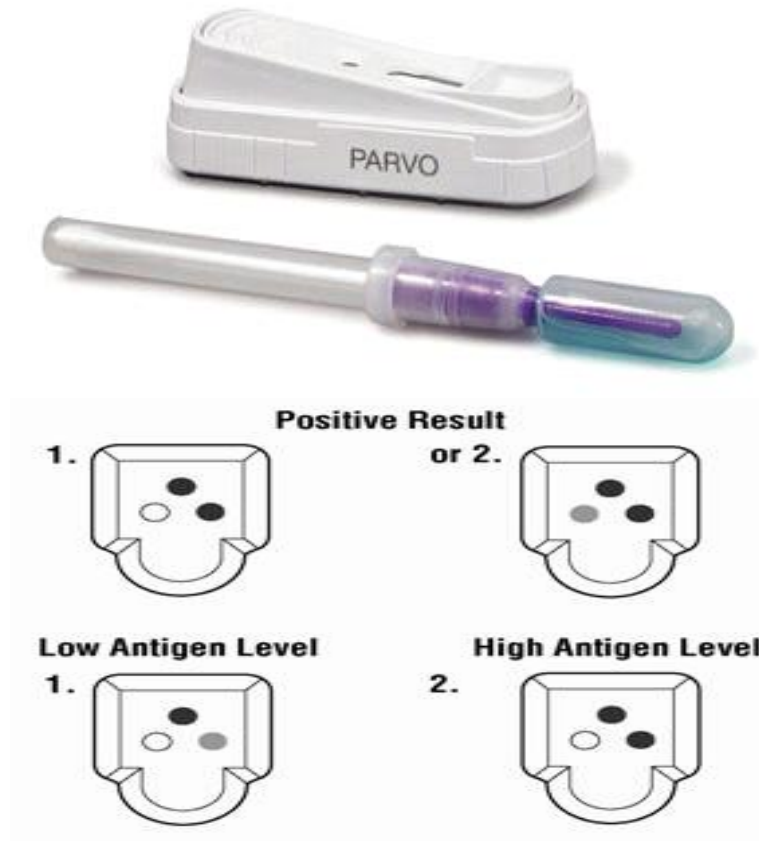


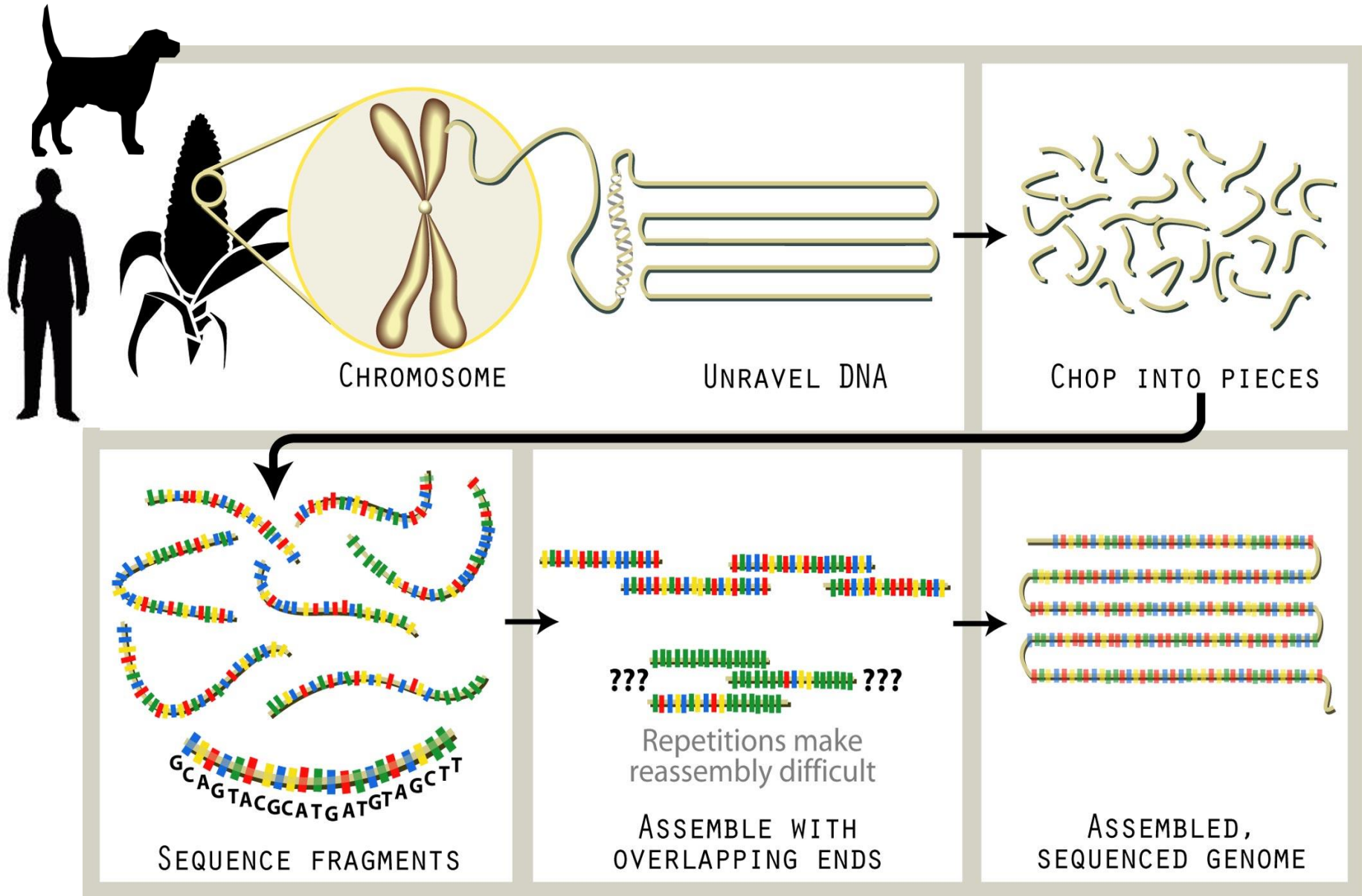
Figure 1



Técnicas moleculares no diagnóstico das infeções virais

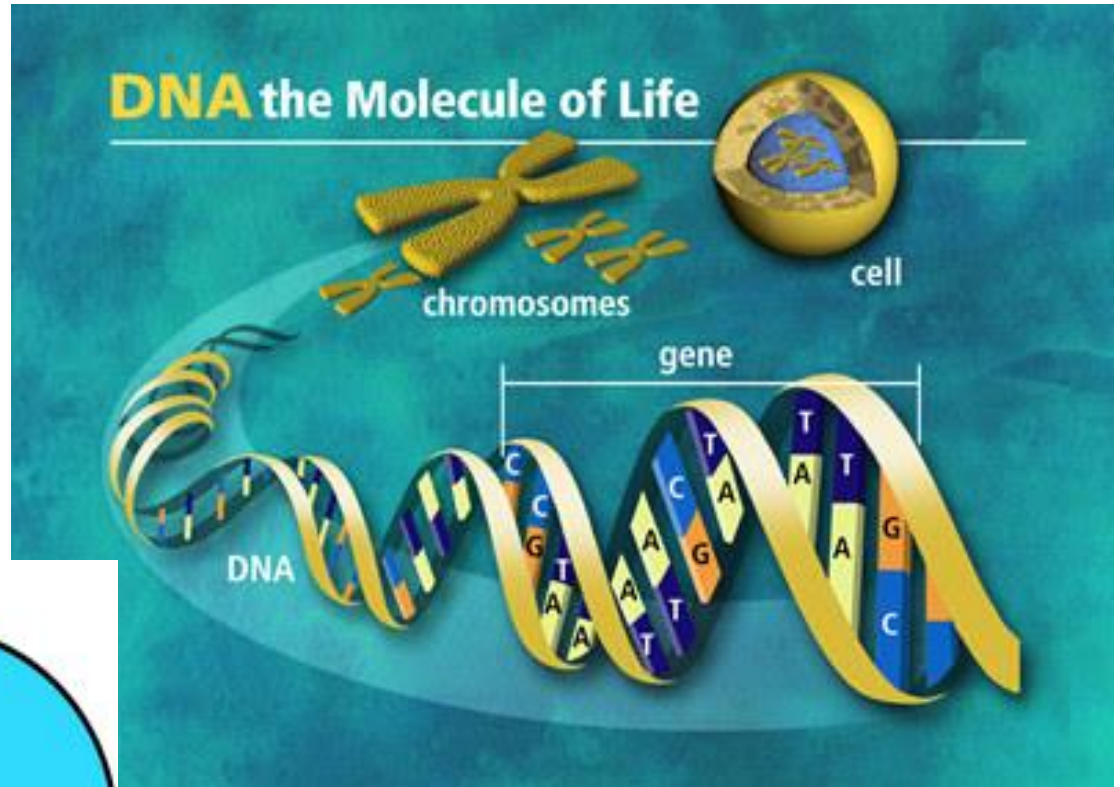
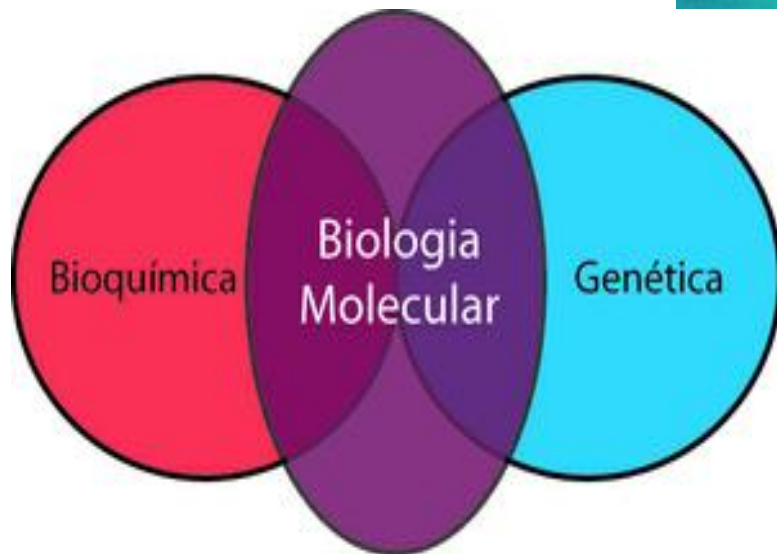


-DNA → Informação genética → Ordem correta

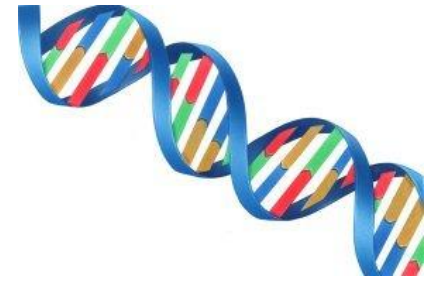


O DNA

A identificação de moléculas de ácidos nucleicos tornou-se a maneira mais fácil de se chegar a uma dada proteína

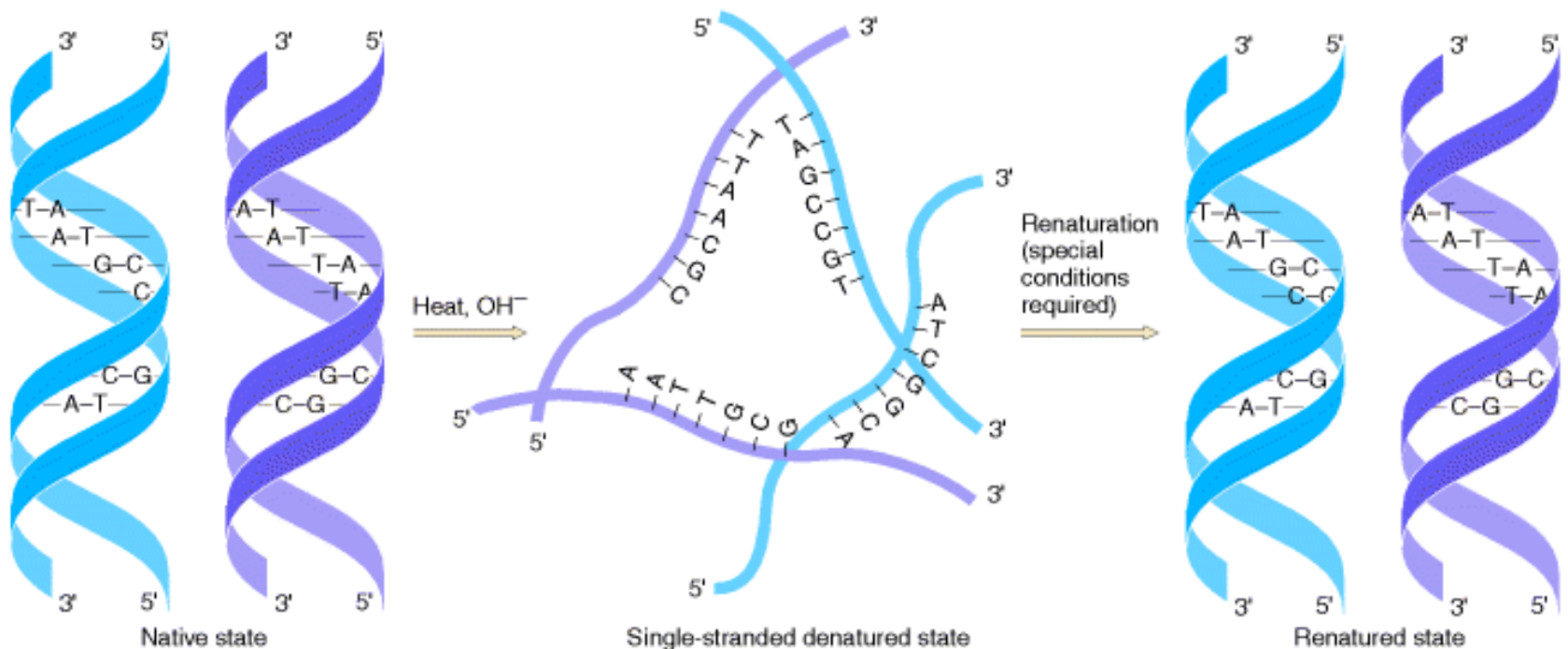


O DNA



Característica físico-química do DNA :

Desnaturação e Renaturação



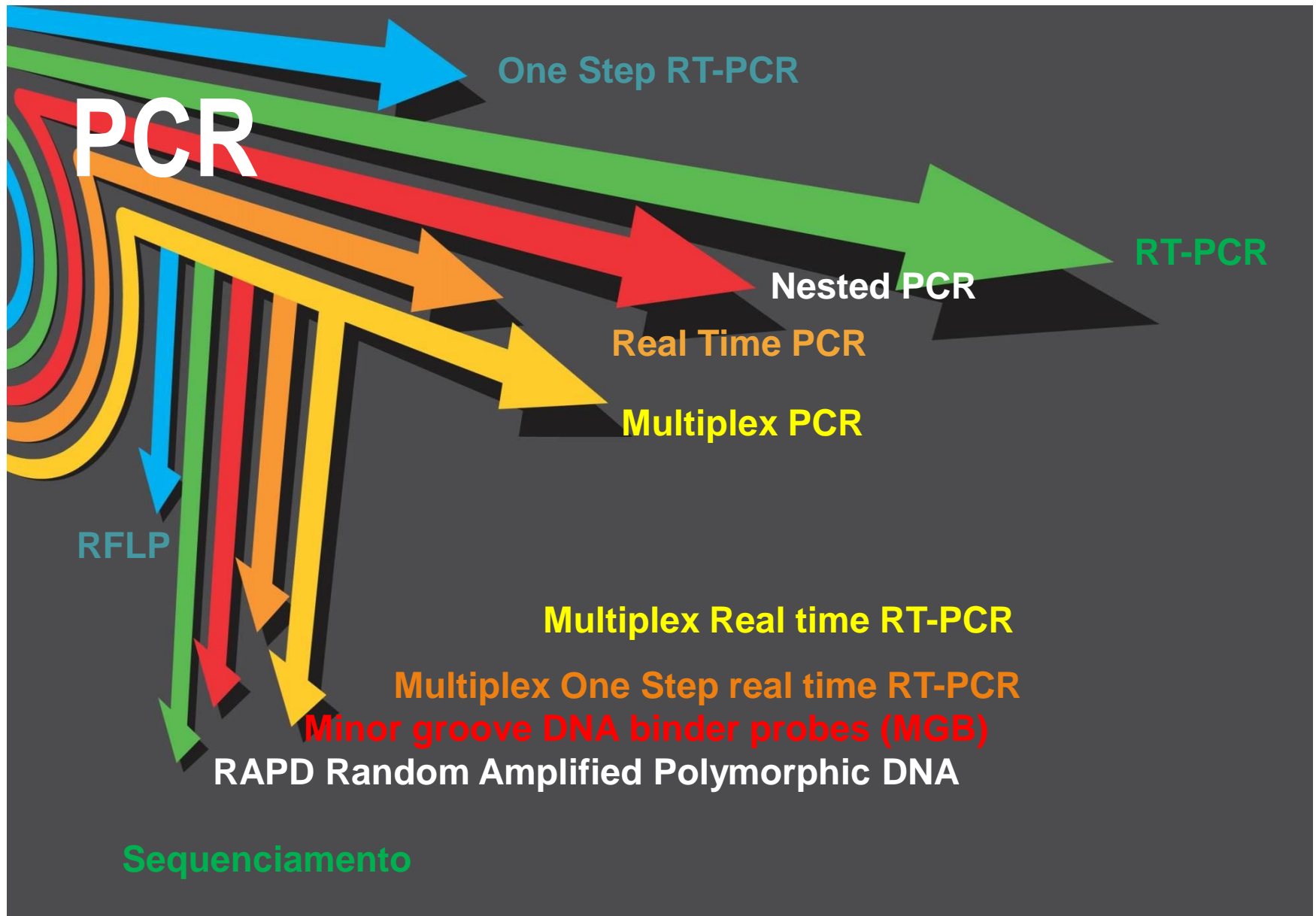
Polimerização de DNA em Cadeia



Polimerização é feita por uma DNA polimerase termoestável

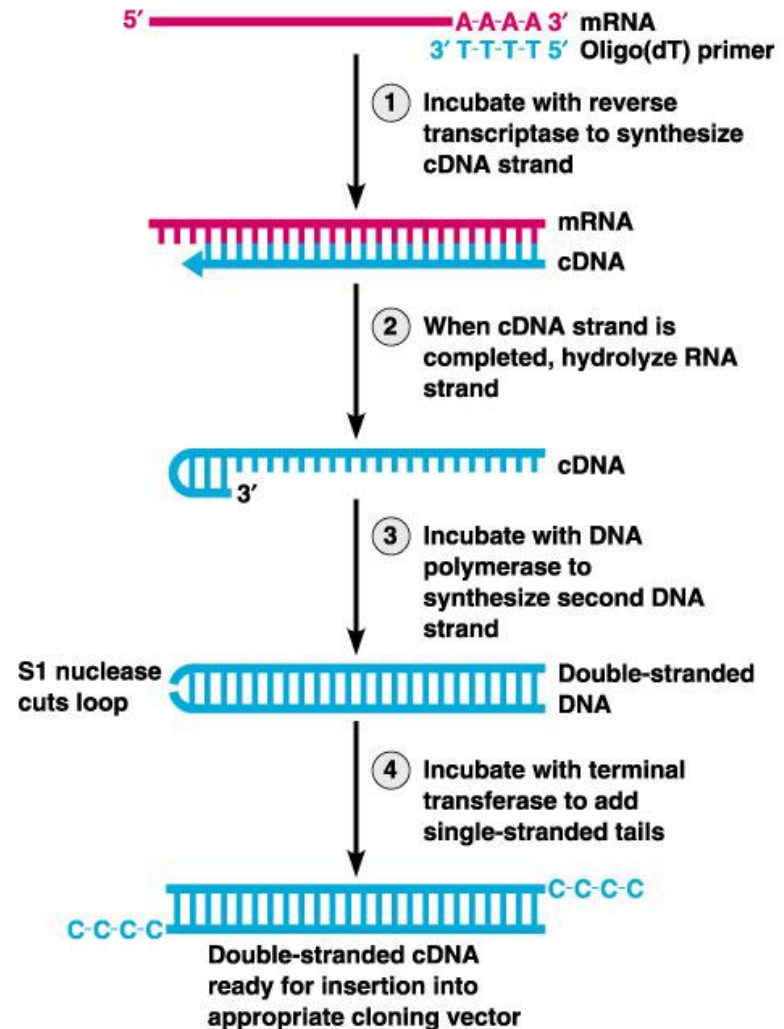
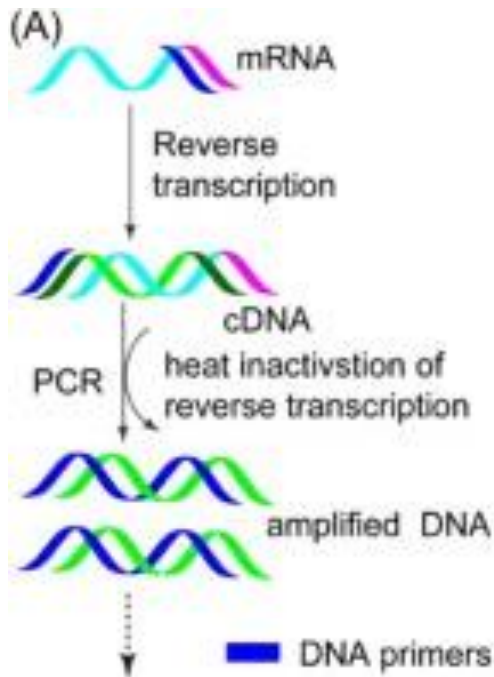
- São utilizados *dois "primers"*, o que delimitam o segmento amplificado e determinam o crescimento exponencial do número de moléculas de DNA
- Triagem X Tipagem
- Sensibilidade : 10 cópias de genoma

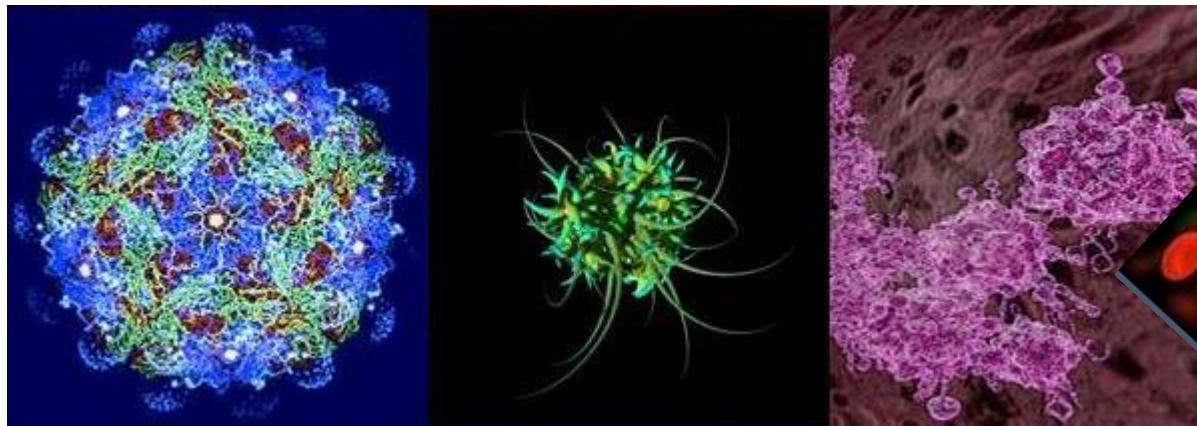
A partir da PCR, quantas outras técnicas foram desenvolvidas?



PCR precedida pela transcrição reversa (RT-PCR)

Vírus de genoma RNA





PCR em tempo real (PCR quantitativo) e suas aplicações na virologia

PCR em tempo real (PCR quantitativo)

- Ø Descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores
- Ø O PCR em tempo real (*real-time PCR*) é capaz de detectar sequências específicas de produtos de PCR durante o processo de amplificação.
- Ø Pode assim determinar o acúmulo do produto de interesse e quantificar o número de substrato presente na amostra inicial.
- Ø Dispensa a realização de revelação através da eletroforese em gel
- Ø Tamanho dos fragmentos amplificados PCR quantitativo X qualitativo

PCR em tempo real (PCR quantitativo)

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

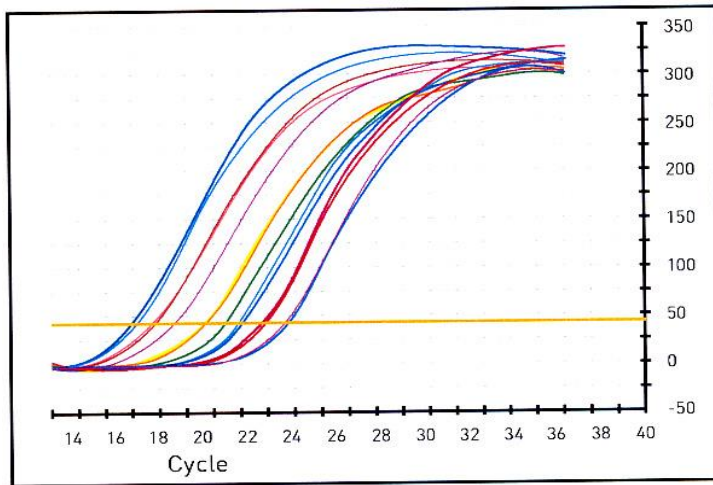
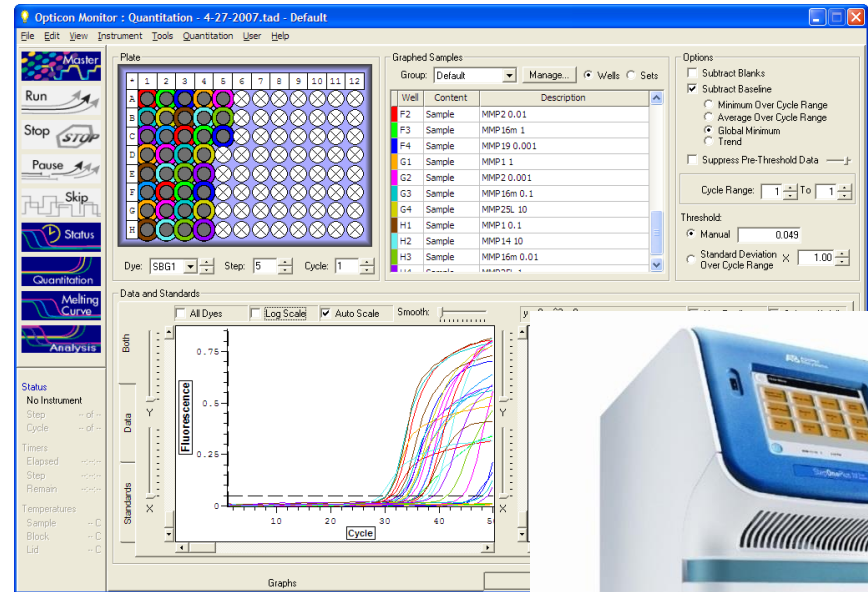


Figure 1. Amplification plot of 2 x serial diluted cDNA derived from primary fibroblasts using the 18S rRNA Control Kit Yakima Yellow®.



A fluorescência é monitorada durante cada ciclo de amplificação e um gráfico é gerado, permitindo o acompanhamento da reação. A fluorescência é proporcional ao aumento da concentração de um produto de PCR.

PCR em Tempo Real

- Coleta de dados na fase exponencial
- SEM manipulação pós-PCR
- Resultados quantitativos
- Requer concentrações de DNA/cDNA 1000 x <
- Tempo de reação reduzido
- Maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão

PCR Convencional

- Coleta de dados na fase final da reação (plateau)
- Manipulação pós-PCR
 - Preparação de gel de agarose - visualização
 - Resultados qualitativos
 - Requer concentrações maiores de DNA/cDNA
 - Muito tempo para obter resultados



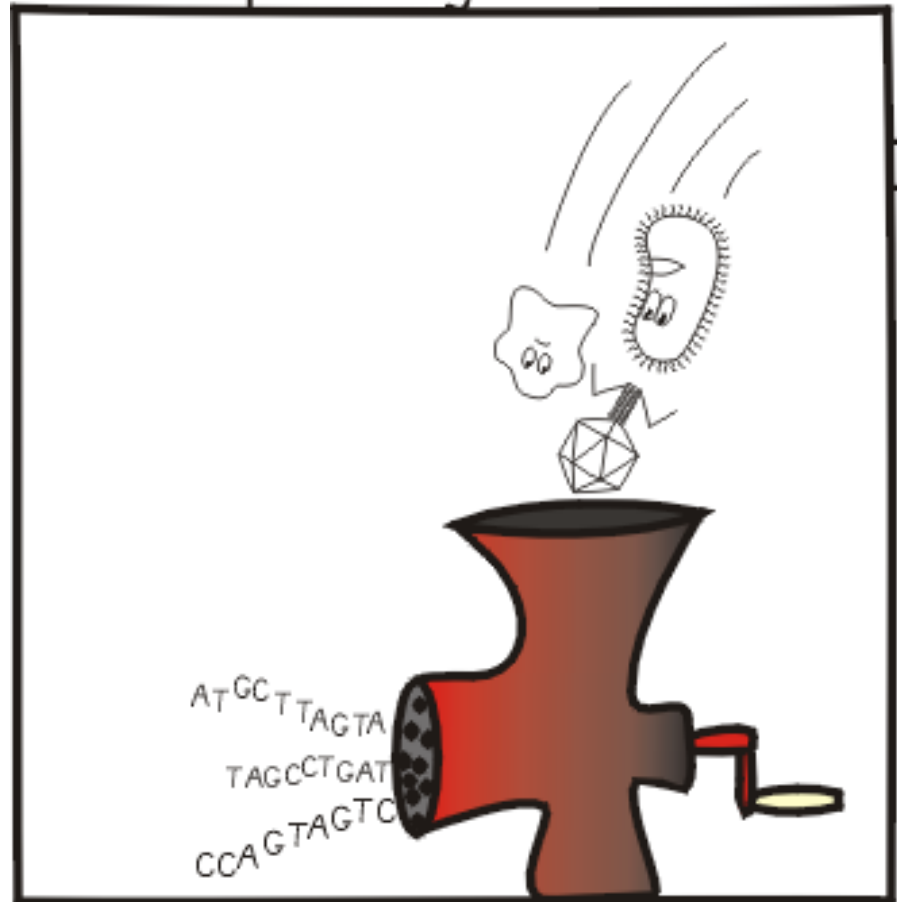
Sequenciamento e análise filogenética e aplicações

Objetivos do Sequenciamento na virologia

Realizar estudos sobre origem, variações, mutações dos genes de microrganismos

Comparando o genoma obtido com outros genomas disponíveis em bancos de dados.

Mass sequencing



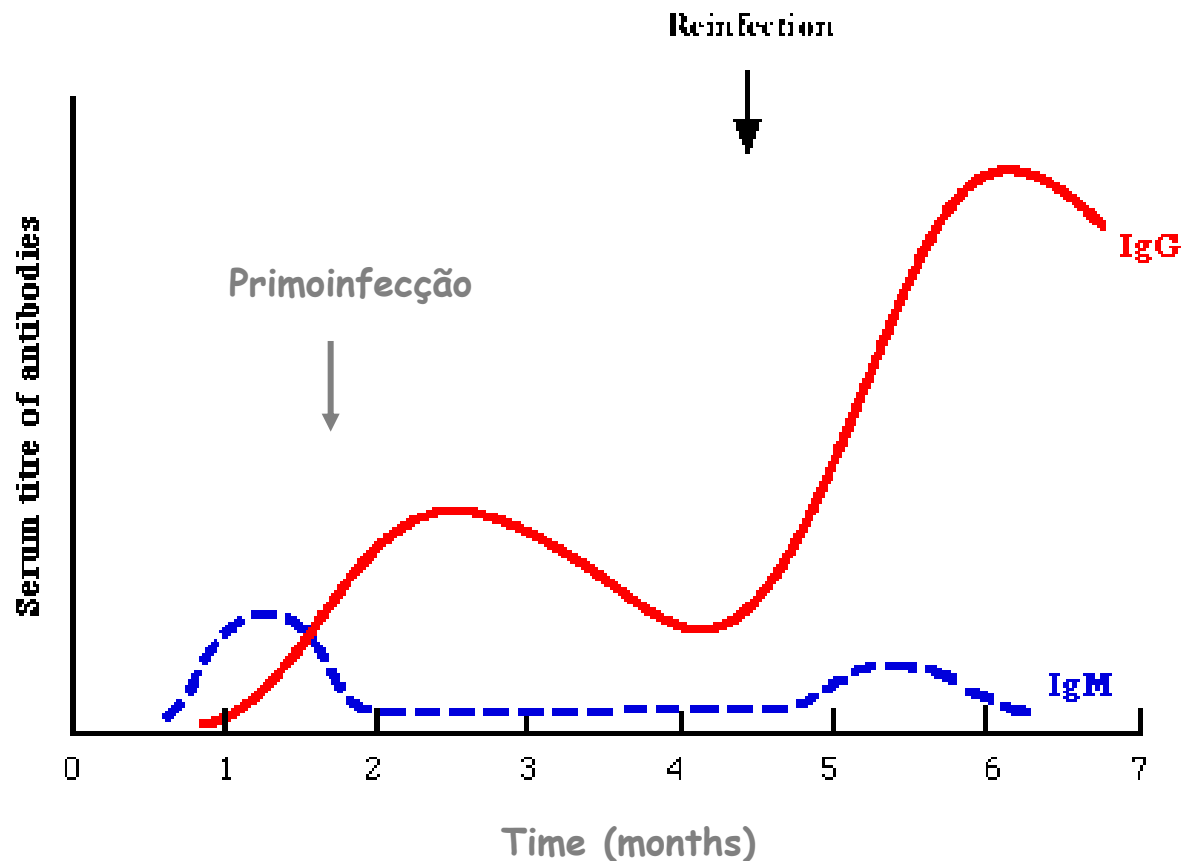
Stripped Science

by Viktor S. Poór

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

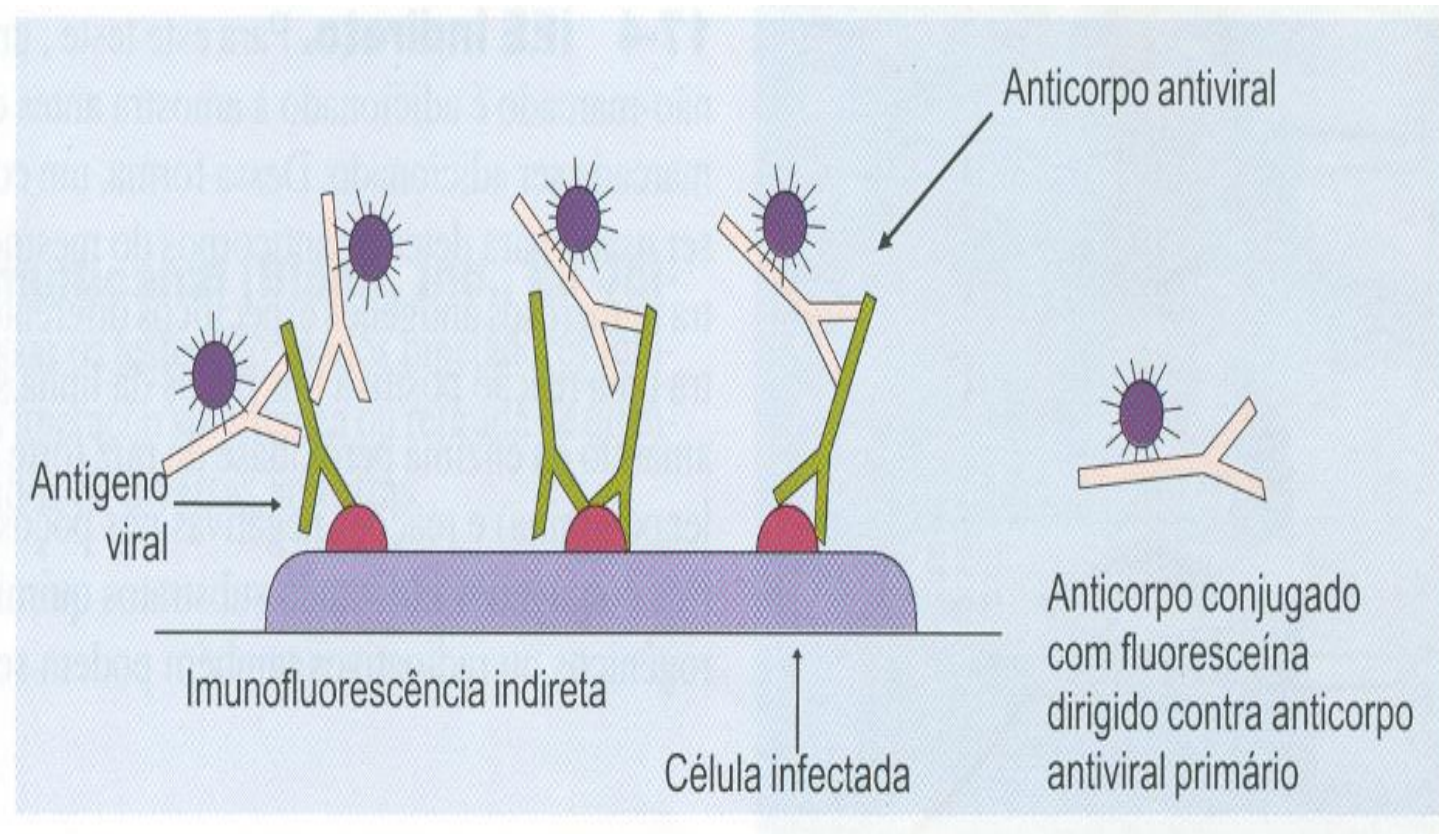
Observar um aumento, de pelo menos 4 vezes, no título de anticorpos do soro de fase convalescente em relação ao soro de fase aguda

Reações Imunológicas:

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

Reação de Imunofluorescência indireta:

IFI



Ensaio Imunoenzimático Indireto (EIE):

pesquisa de Ac

