



DEPARTAMENTO DE
MICroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Métodos para estudo e diagnóstico de Vírus

Enrique Boccardo

Depto. Microbiologia – ICB/USP

eboccardo@usp.br

Estudo de Vírus

Métodos:

Diretos

Microscopia
Eletrônica

Indiretos

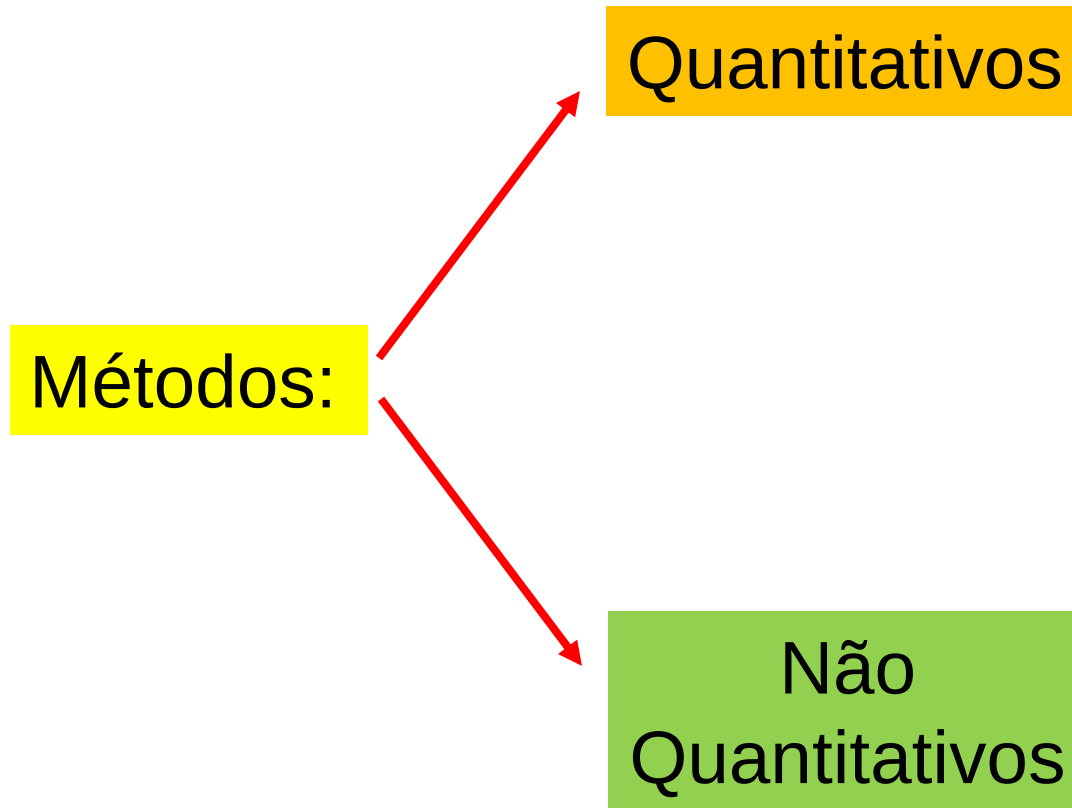
Cultivo
Análise de Proteínas
Análise de Ácidos nucleicos
Métodos sorológicos

Estudo de Vírus

Métodos:

Quantitativos

Não
Quantitativos



Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

Importância

- Confirmação da etiologia devido a gravidade da doença
Rubéola, hepatites, AIDS
- Diferenciação do quadro clínico
hepatites, citomegalia, mononucleose
- Infecção passível de aplicação de quimioterapia
papilomavírus, herpesvírus, HIV
- Acompanhamento do quadro evolutivo
hepatites, AIDS
- Vigilância epidemiológica

Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

Escolha da amostra

Tipo de Infecção	Espécime
Entérica	fezes
Genital	swab genital, raspado, biópsia
SNC	liquor, sangue, fezes
Ocular	swab ocular, secreção
Pele	secreção vesicular, raspado, biópsias
Respiratória	swab nasal, lavado naso-faríngeo, punção
Sistêmica	sangue

Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

Cuidados fundamentais

Momento ideal para colheita do material

- fase aguda da doença ou pródromo (diagnóstico)
- fase de convalescença (confirmação)
- periódico (prognóstico)

Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

Cuidados fundamentais

- Transporte do material
 - preferencialmente a 4°C
 - a -20°C (vírus nus)
 - a -20°C com crioprotetor (longas distâncias)
 - acondicionamento em solução tamponada
 - frasco inquebrável
 - encaminhar ao laboratório o mais rápido possível

Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

- ❖ Métodos laboratoriais:

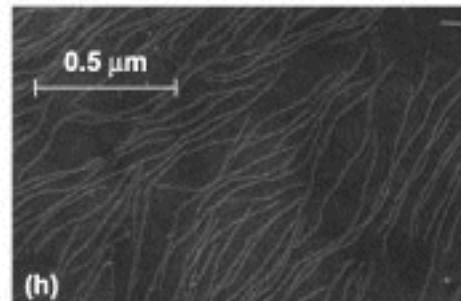
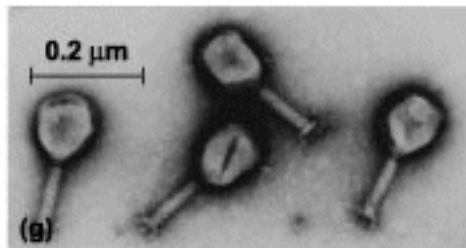
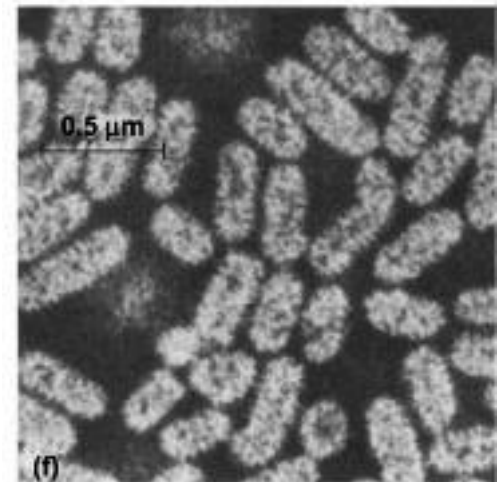
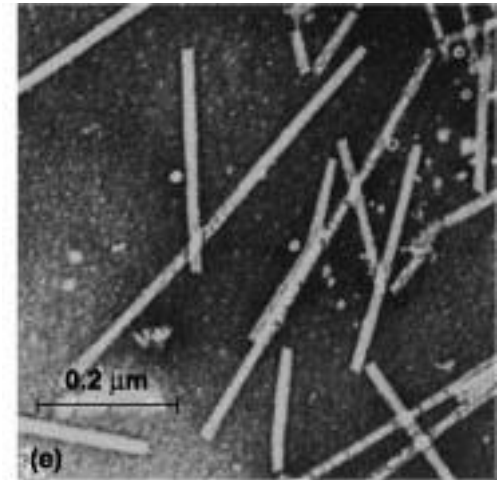
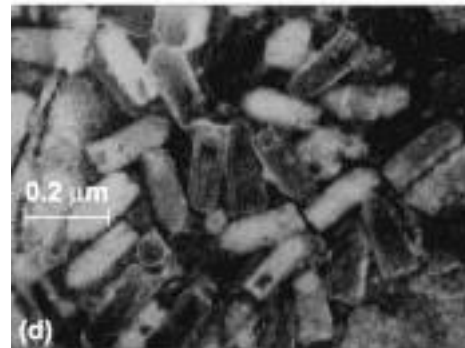
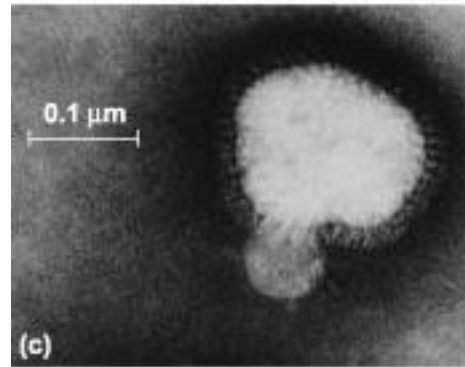
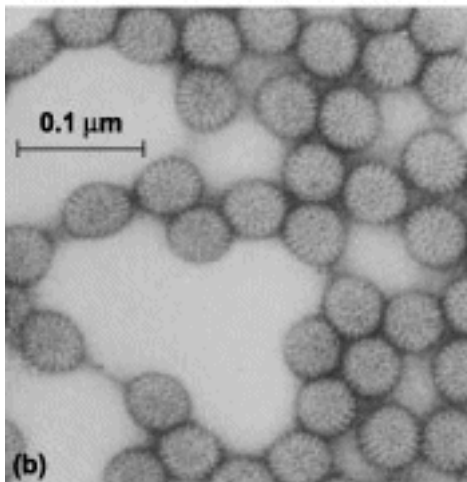
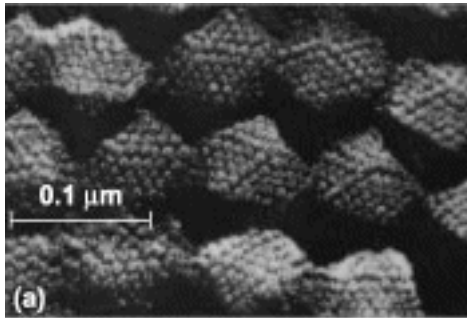
- ❖ Diagnóstico clássico

- ❖ Diagnóstico rápido

- ❖ Diagnóstico molecular

Microscopia Eletrônica

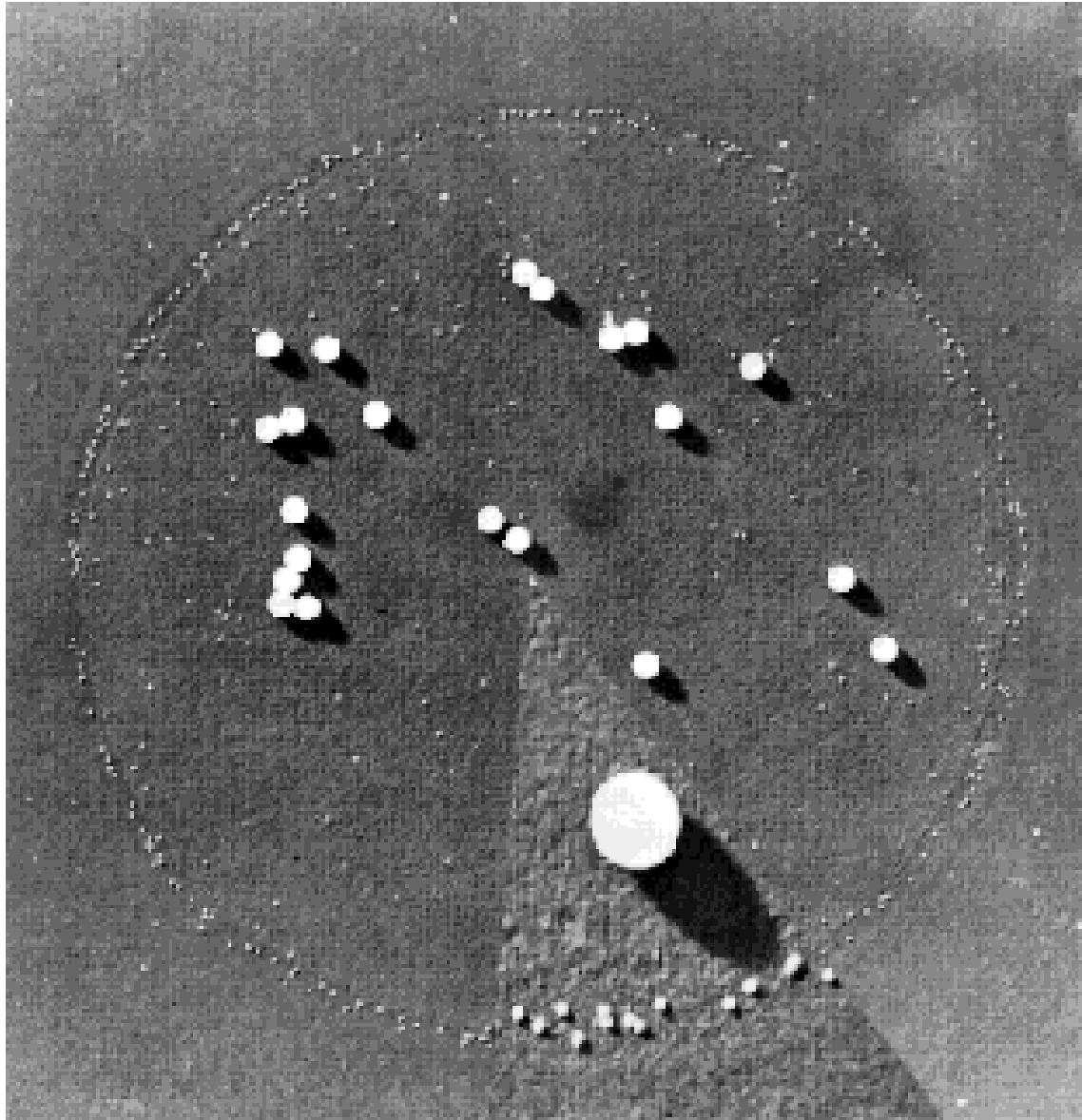
Estudo de Vírus



Direto

Estudo de Vírus

Quantitativo



Estudo de Vírus

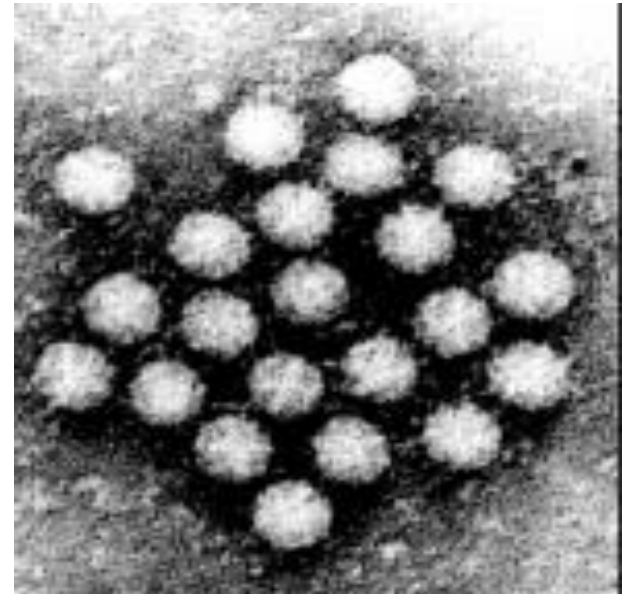
Microscopia eletrônica

Vantagens

- rápido
- boa sensibilidade
- detecção de vírus não cultiváveis

Desvantagens

- nem sempre disponível
- não aplicável a todos os vírus
- resultados falso-positivos e falso-negativos



Métodos Baseados em cultivo de vírus

Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

Diagnóstico clássico

Cultivo - Isolamento - Identificação - Sorologia

Vantagens

- ❖ sensibilidade
- ❖ único método
- ❖ detecção de vírus desconhecidos
- ❖ completa caracterização

Desvantagens

- ❖ demorado
- ❖ a ser confirmado (soroconversão)
- ❖ alguns vírus não são cultiváveis
- ❖ falso isolamento
(vírus facilmente cultiváveis
suplantam outros)

Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

Diagnóstico clássico

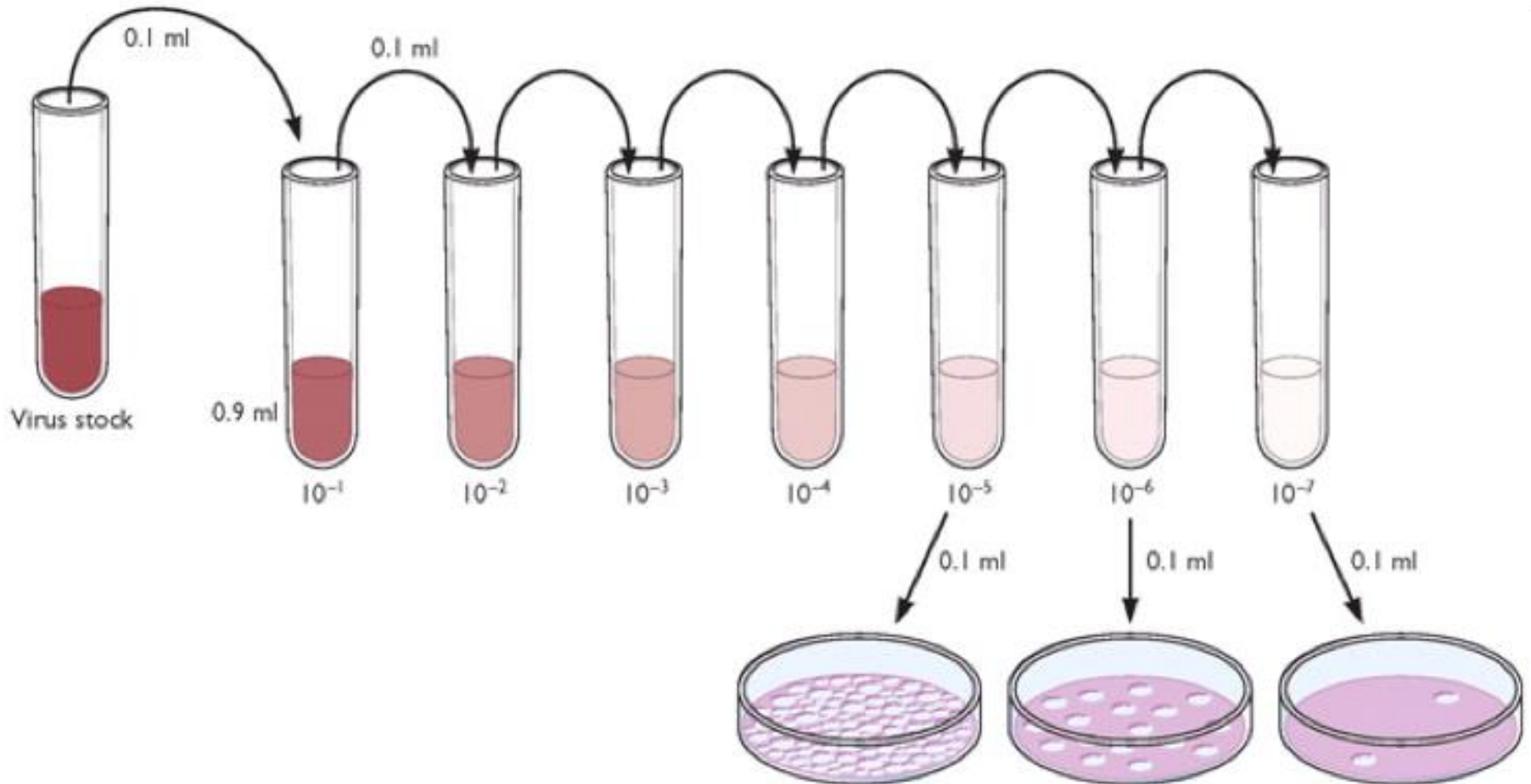
Isolamento

- animais de laboratório
- ovos embrionados de galinha
- Alta sensibilidade
- Única alternativa para alguns vírus
- Caro - demorado
- Adequado para a vigilância epidemiológica



Estudo de Vírus

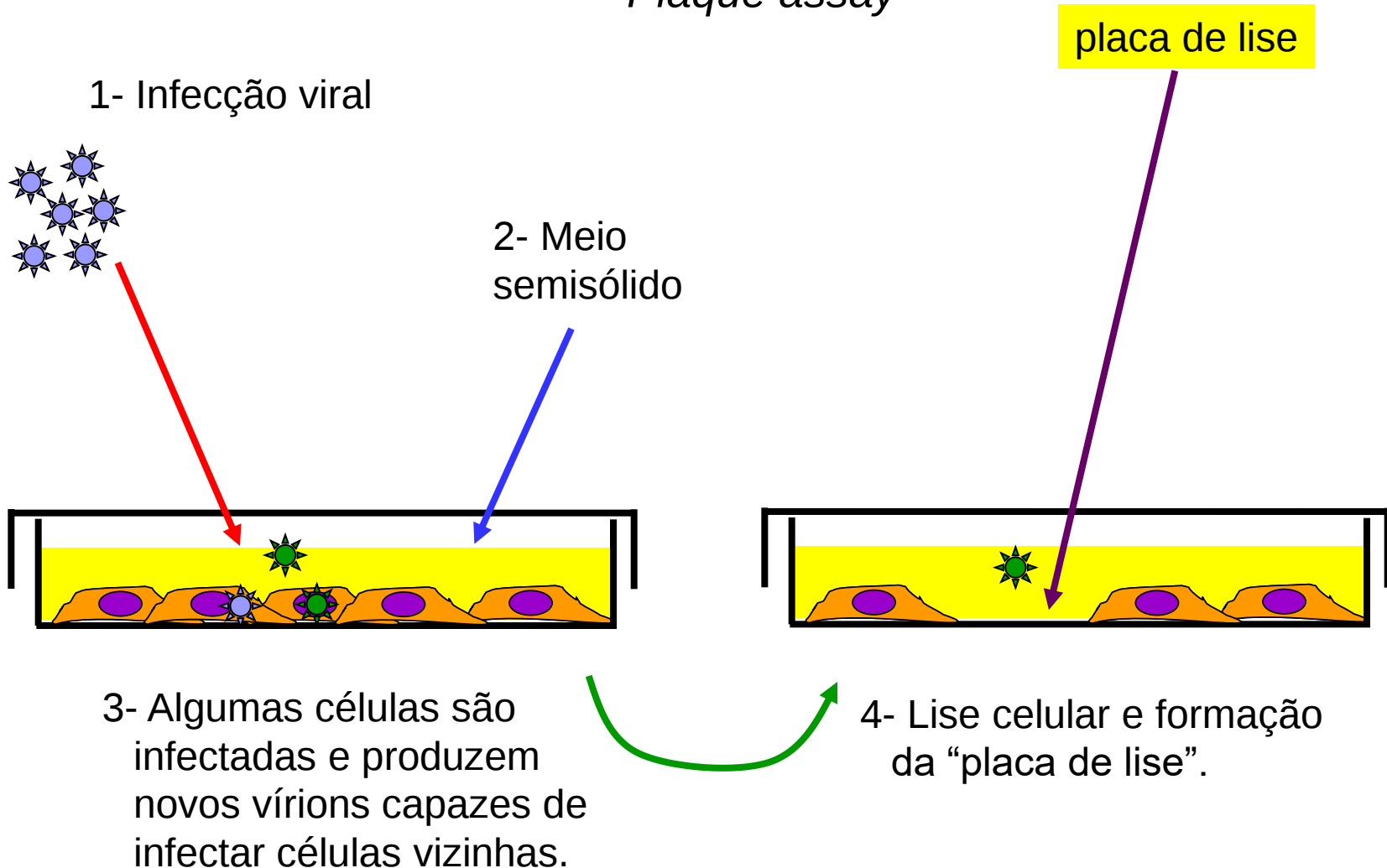
Tudo começa com a diluição seriada da amostra:



Estudo de Vírus

Quantitativo

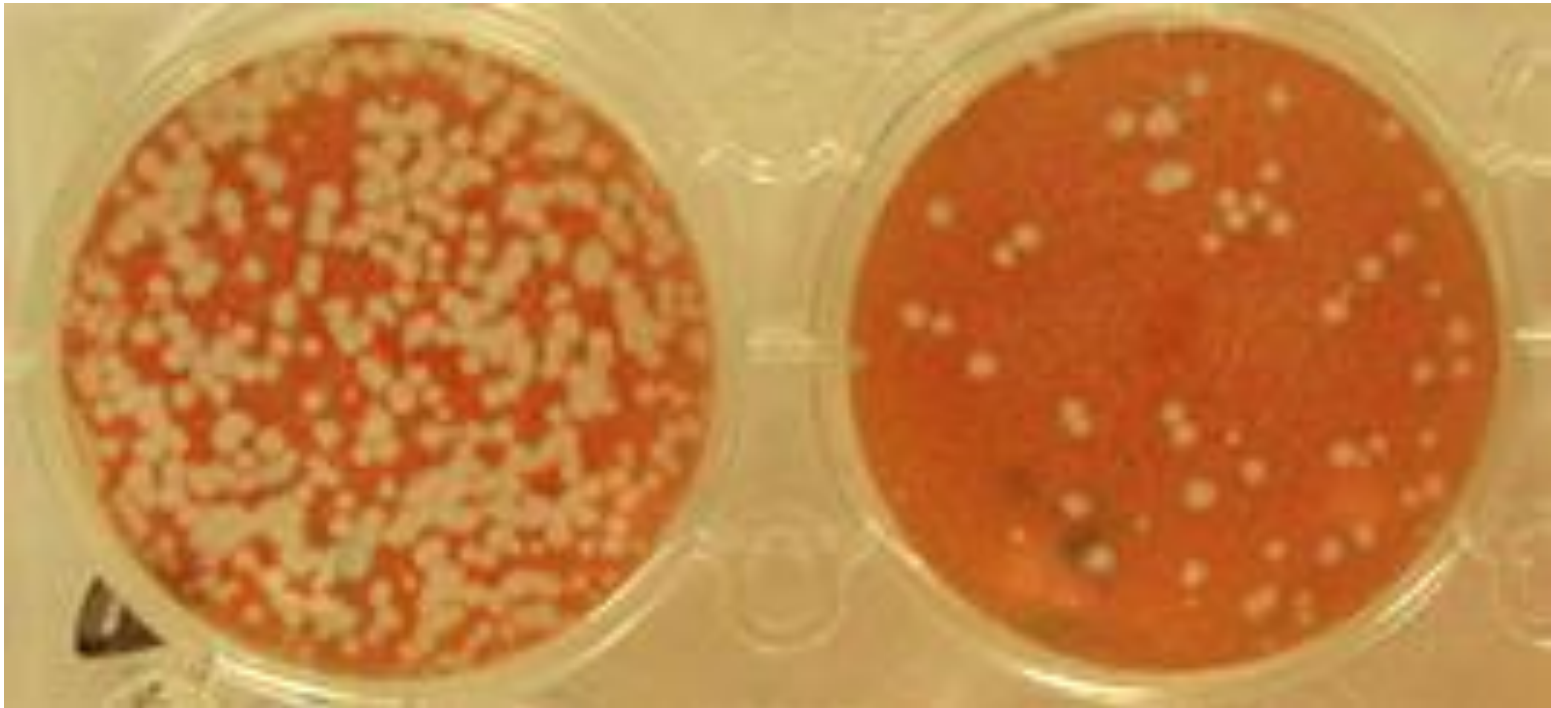
Ensaio de Formação Placas de Lise *Plaque assay*



Estudo de Vírus

Quantitativo

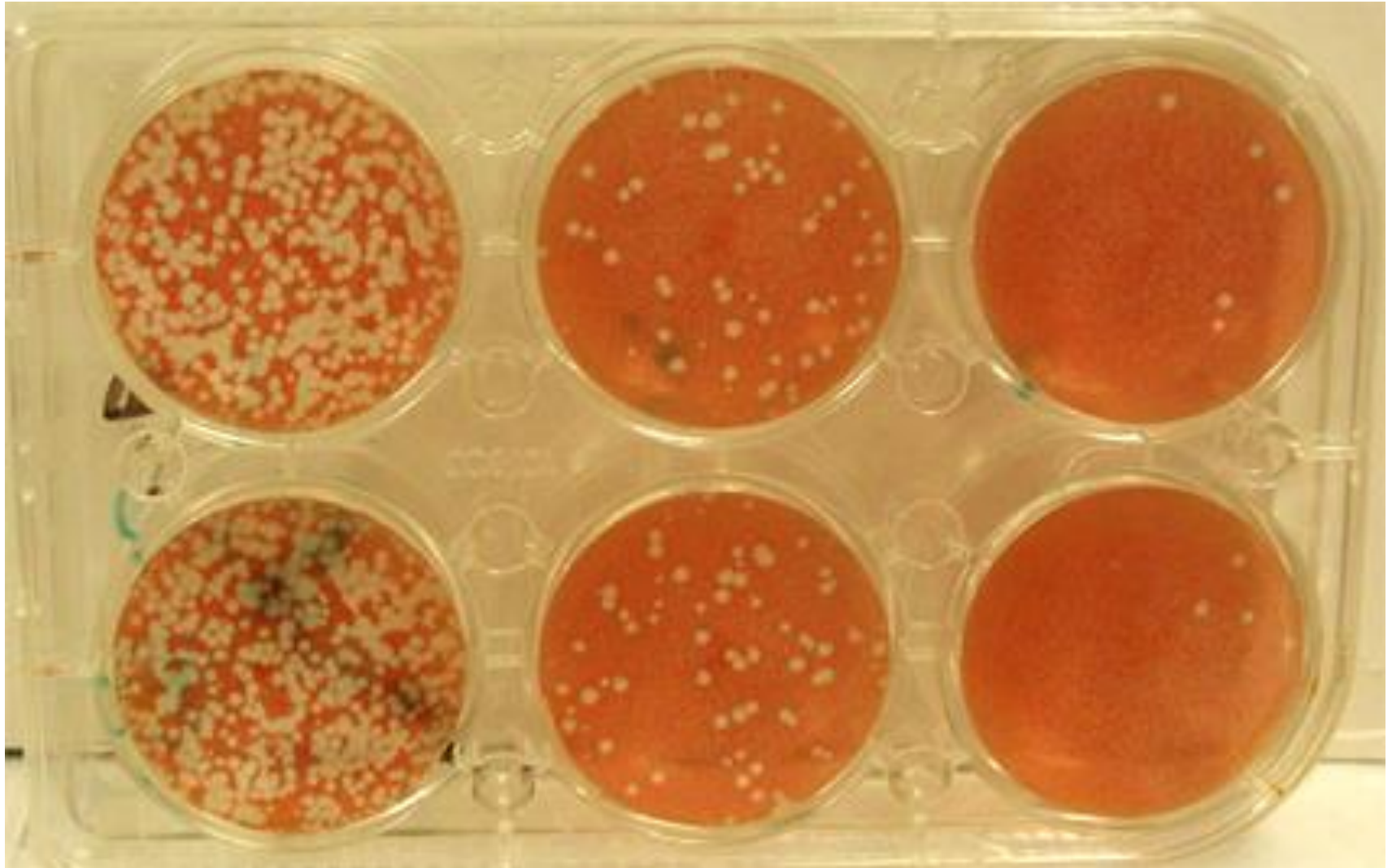
Ensaio de Formação Placas de Lise
Plaque assay



Estudo de Vírus

Quantitativo

Ensaio de Formação Placas de Lise
Plaque assay



Estudo de Vírus

Quantitativo

Ensaio de Formação Placas de Lise
Plaque assay

Características:

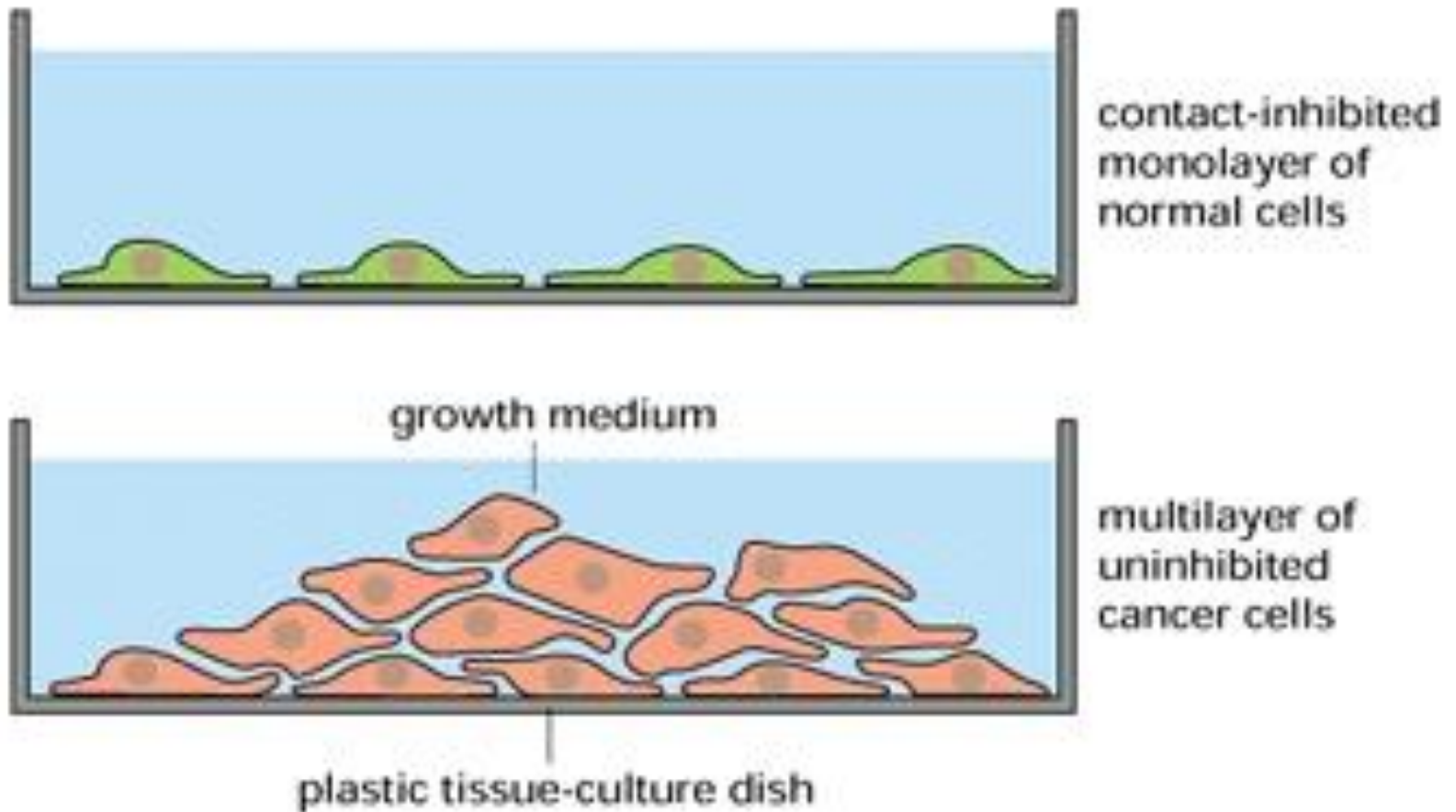
Princípio: 1 partícula viral gera uma placa de lise

- Consome tempo.
- Só funciona para vírus que infectam células que crescem em monocamada e causam lise celular.
- Método muito simples

Estudo de Vírus

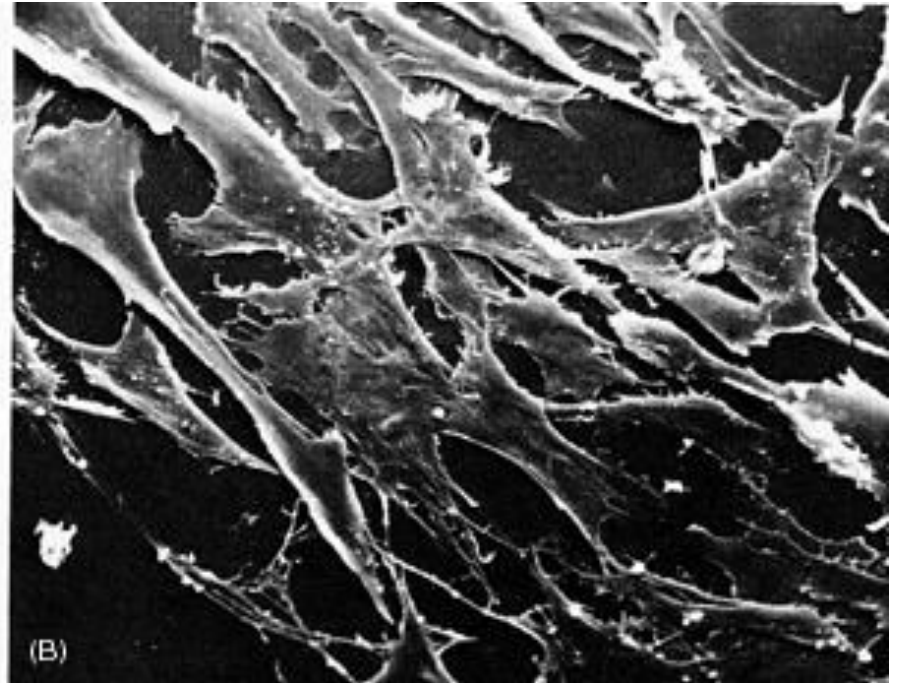
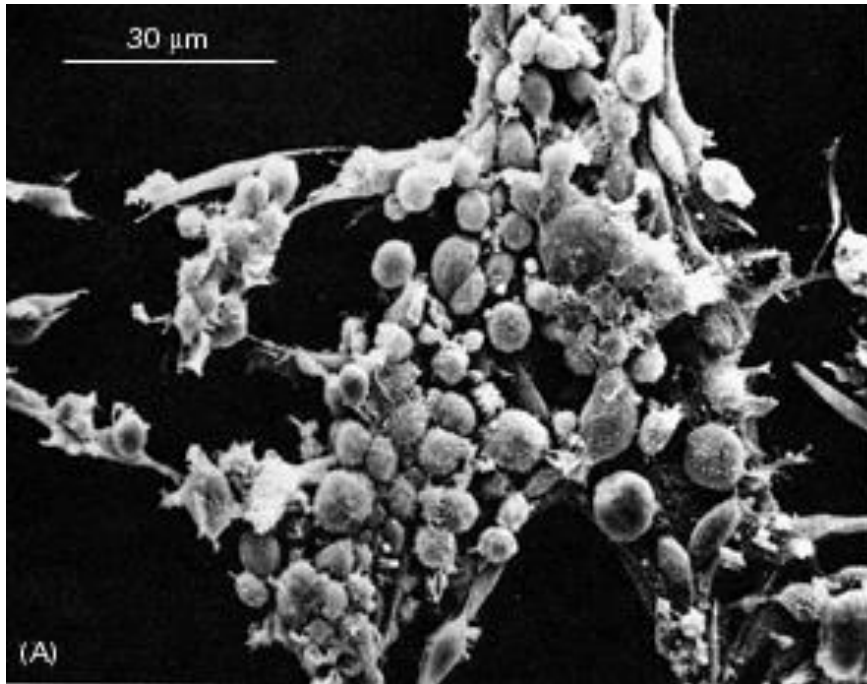
Quantitativo

Ensaio de Formação de Focos de Transformação
Focus assay



Estudo de Vírus

Ensaio de Formação de Focos de Transformação
Focus assay



Quantitativo

Estudo de Vírus

Quantitativo

Ensaio de Formação de Focos de Transformação
Focus assay

Características:

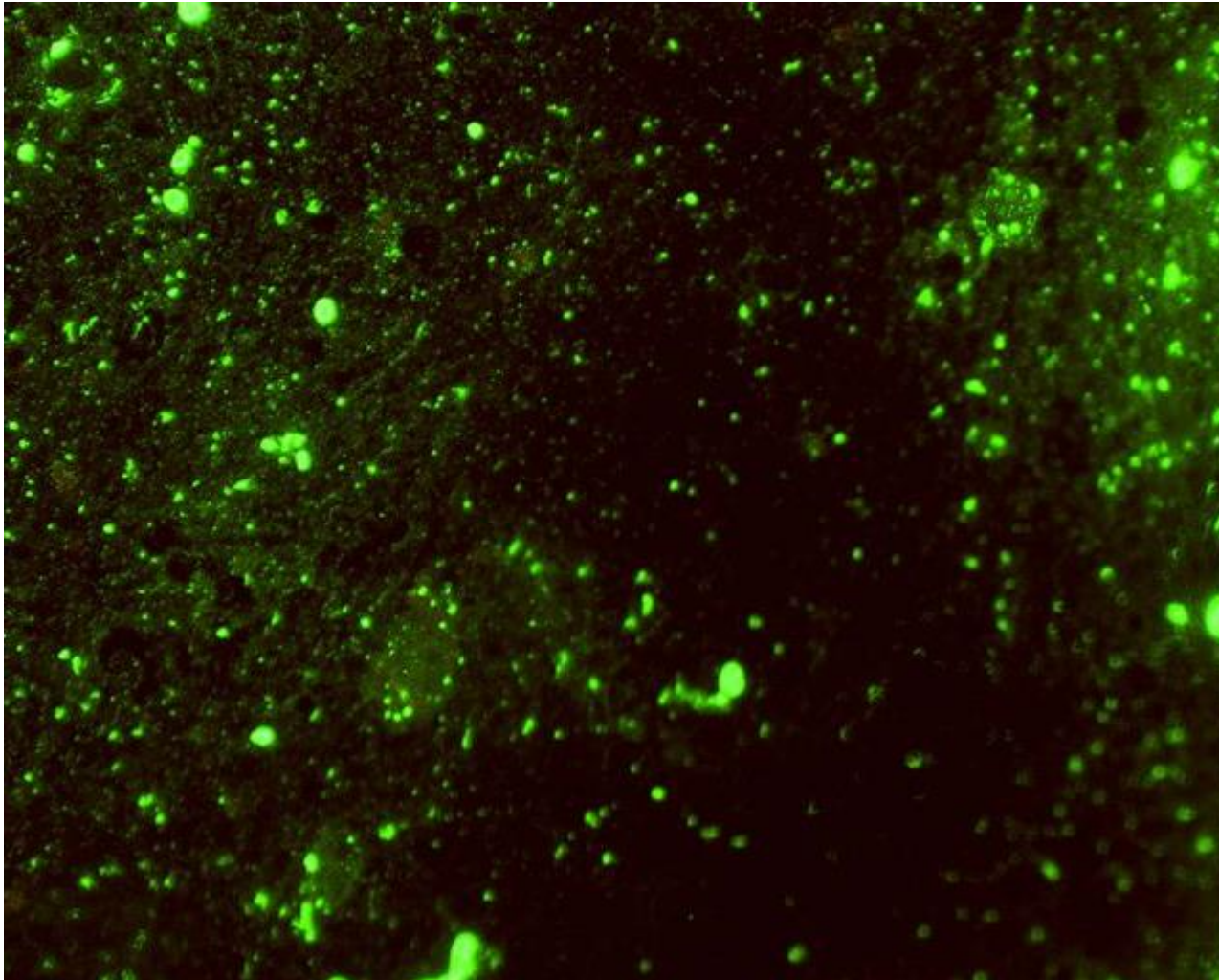
Princípio: 1 partícula viral gera uma placa de lise

- Consome tempo.
- Só funciona para vírus que infectam células que crescem em monocamada e causam transformação celular.
- Método muito simples

Estudo de Vírus

Quantitativo

Ensaio de Formação de Focos fluorescente
Fluorescent Focus assay

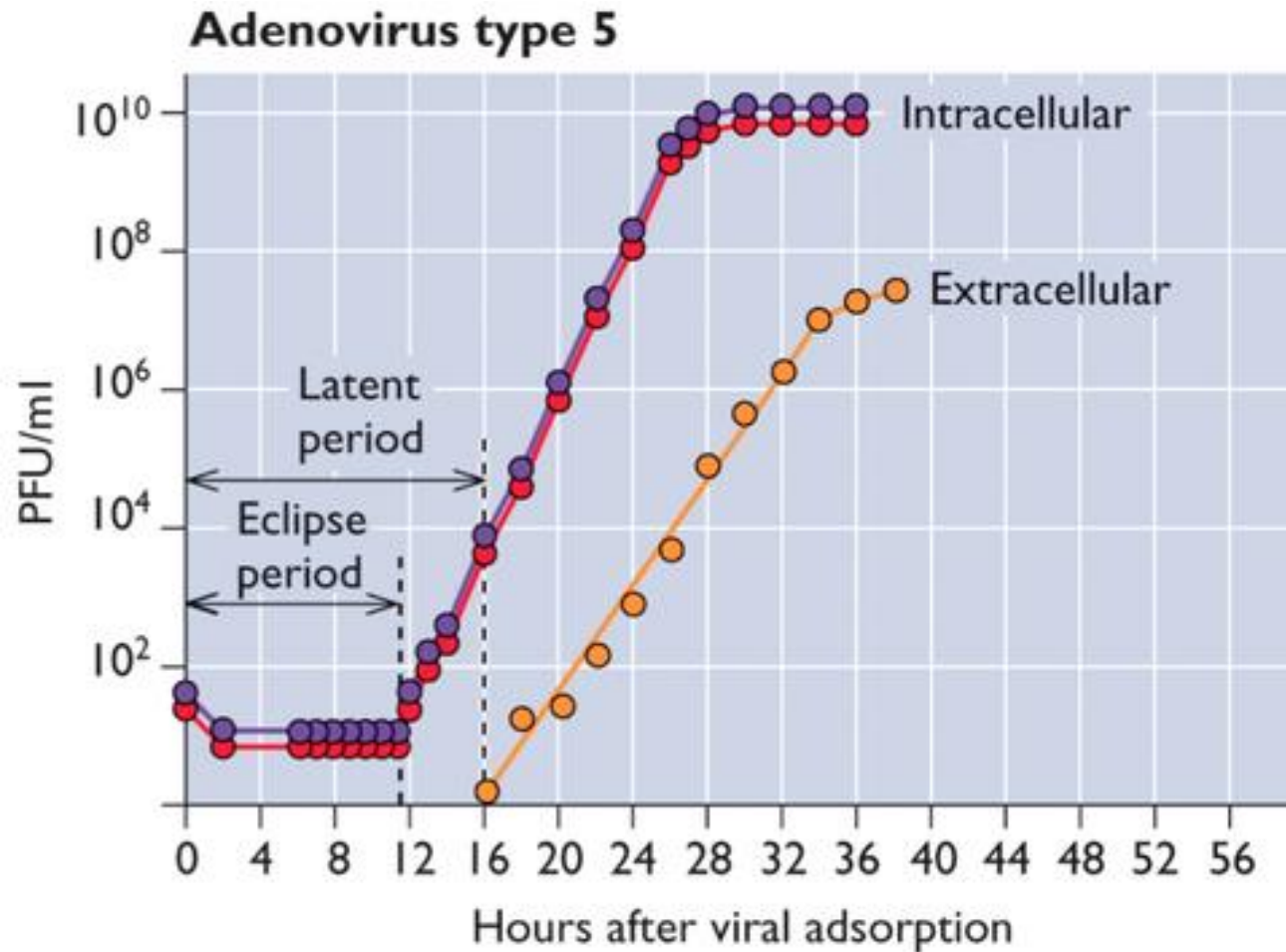


Vírus da raiva em
cultura de células

Esta variação do
método é mais
rápida, porém mais
cara.

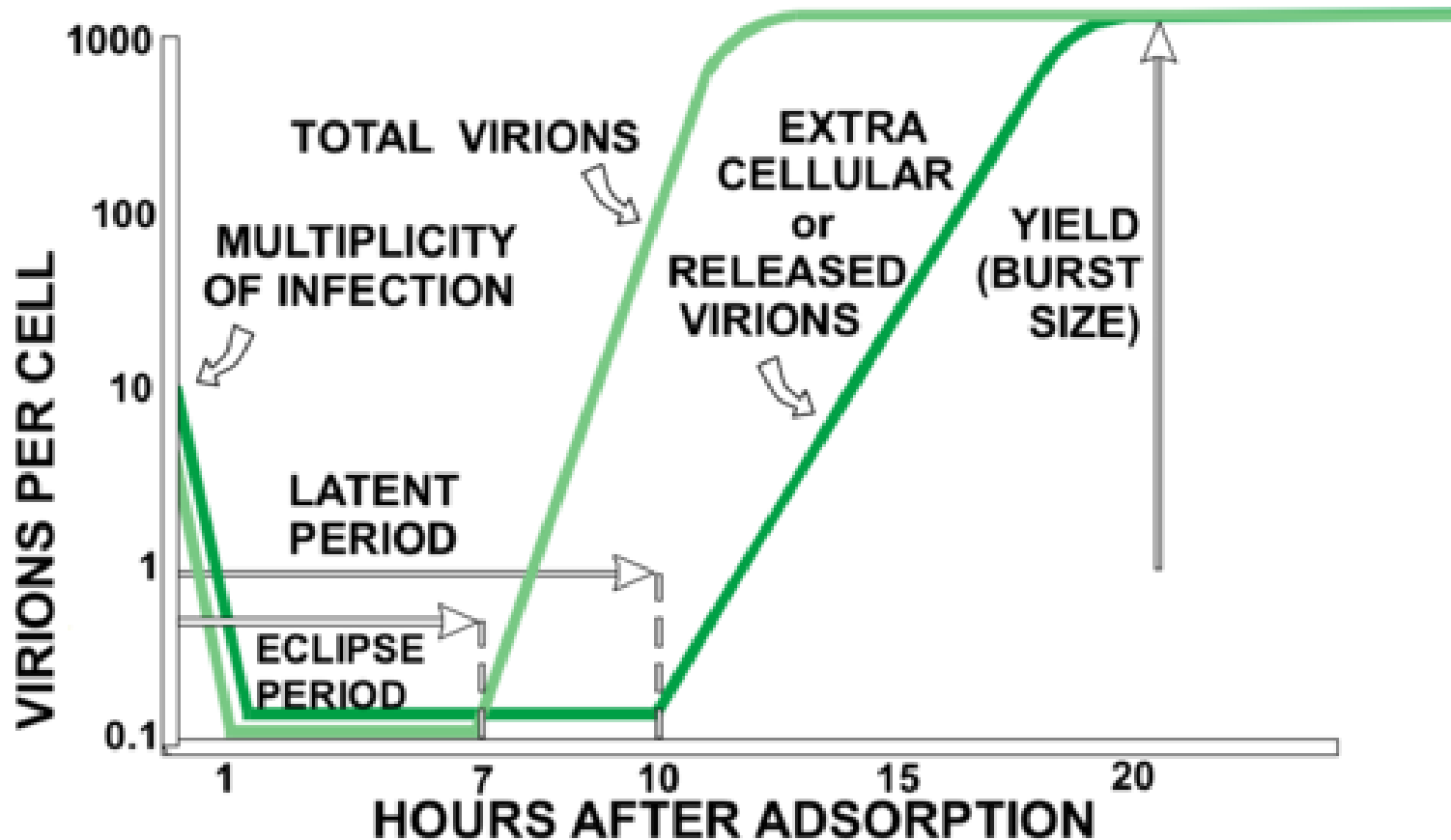
Estudo de Vírus

Curva de Crescimento
One step growth curve



Estudo de Vírus

Curva de Crescimento
One step growth curve

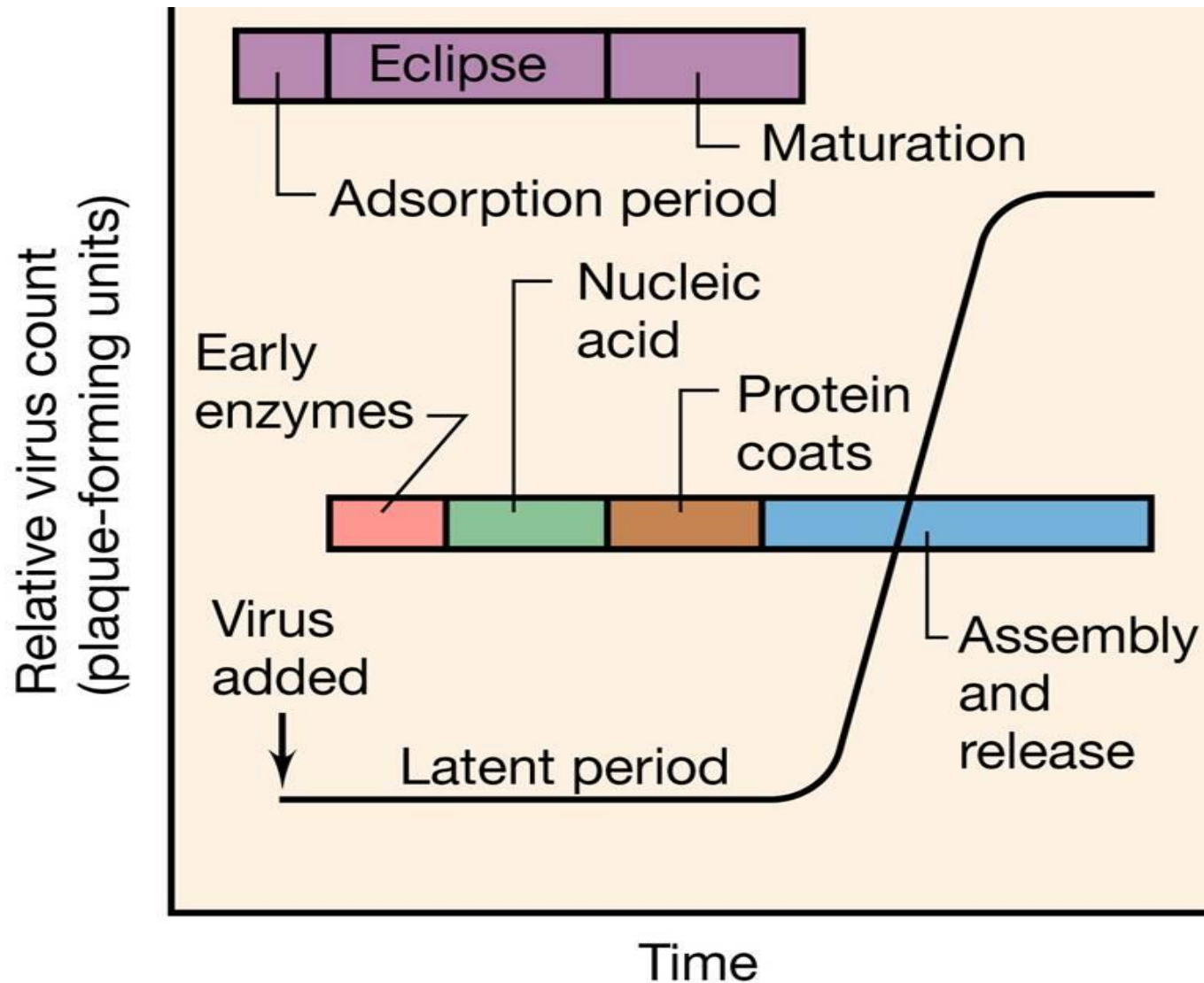


Quantitativo

Qualitativo

Estudo de Vírus

Curva de Crescimento
One step growth curve



Estudo de Vírus

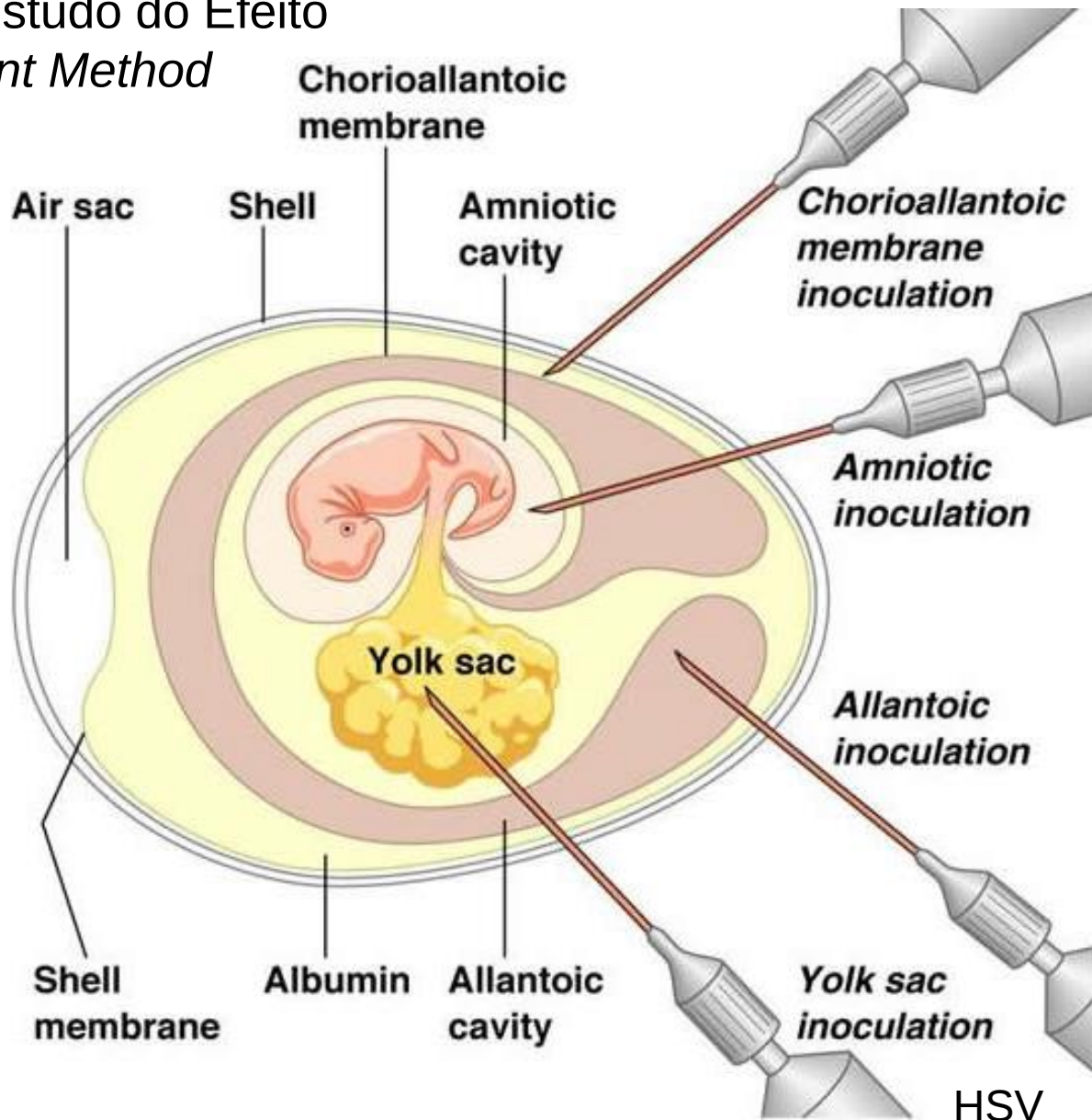
Método de Estudo do Efeito *Endpoint Method*

- Existem vírus que não podem ser adaptados aos ensaios de formação de placa ou focos de transformação.
- No entanto, estes vírus podem produzir um efeito patológico detectável em:
 - Ovos embrionados
 - Cultura de células
 - Animais de laboratório

Estudo de Vírus

Ovos embrionados

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method



HSV
Poxvírus
Rous SV

Influenza
Paramixovírus
(caxumba)

Influenza
Paramixovírus
(caxumba)
Newcastle
Adeno de aves

HSV

Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

Cultura de células

- A presença de vírus em células em cultura pode induzir alterações (ex. morte celular, formação de sinsícios, etc) visíveis ao microscópio.
- Estas alterações são conhecidas como conjuntamente como ***efeito citopático***.
- O efeito citopático é um *Endpoint*

Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

Efeito citopático refere-se a alterações degenerativas em células (especialmente em cultura) associadas à multiplicação de certos vírus.

As alterações incluem:

- Forma alterada

- Perda de adesão ao substrato

- Lise

- Fusão de membrana (sinsílios)

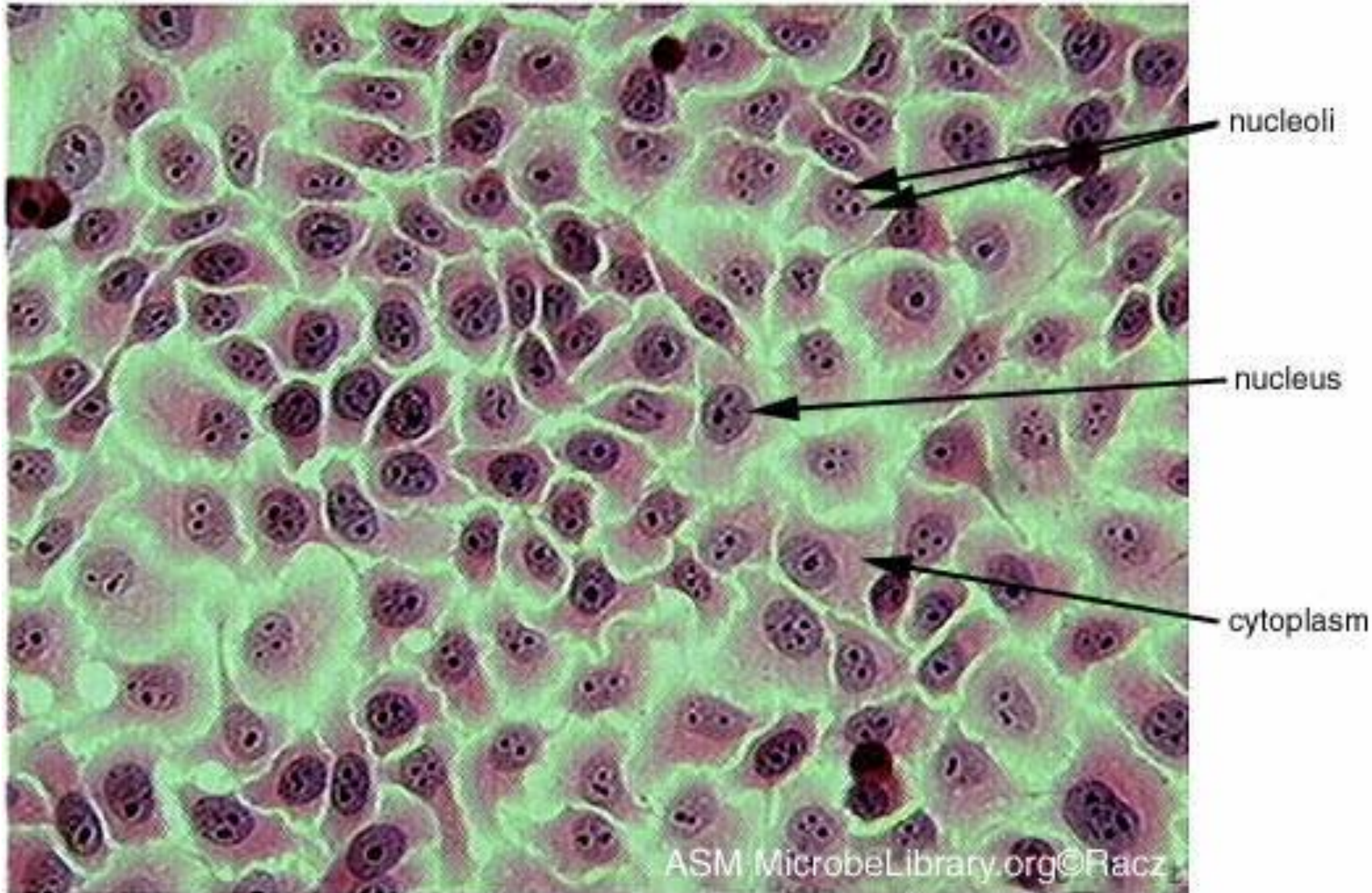
- Presença de corpos de inclusão

- Apoptose

Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

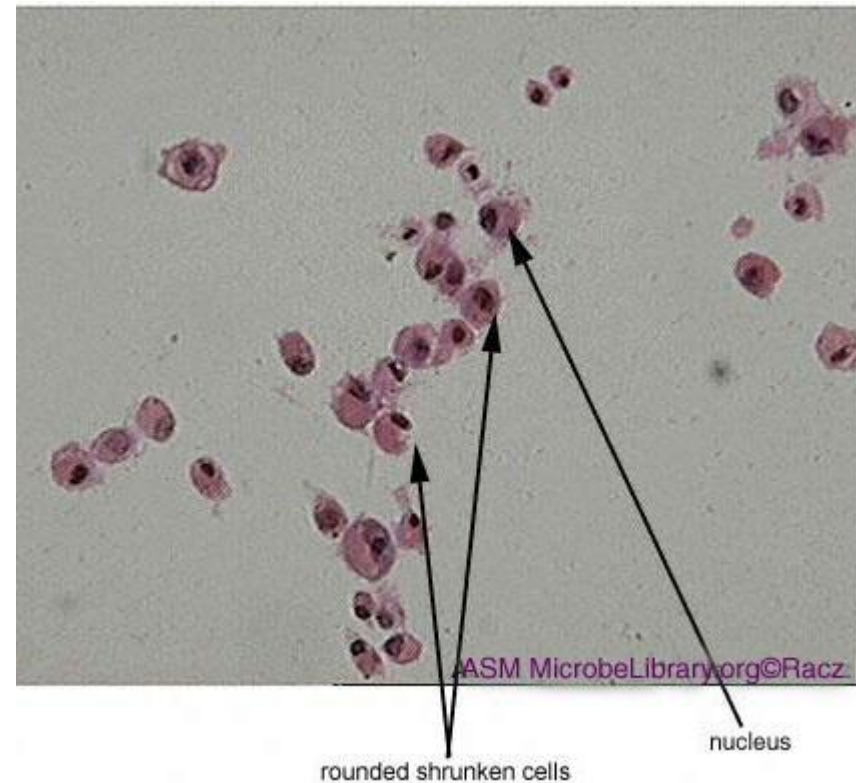
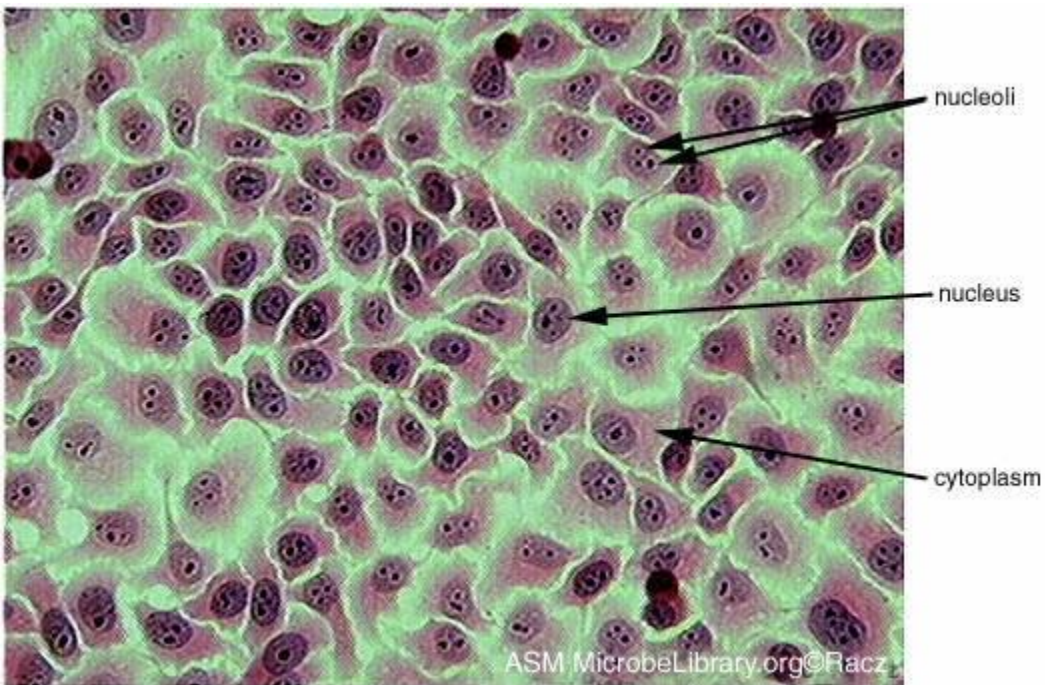
Células Vero



Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito *Endpoint Method*

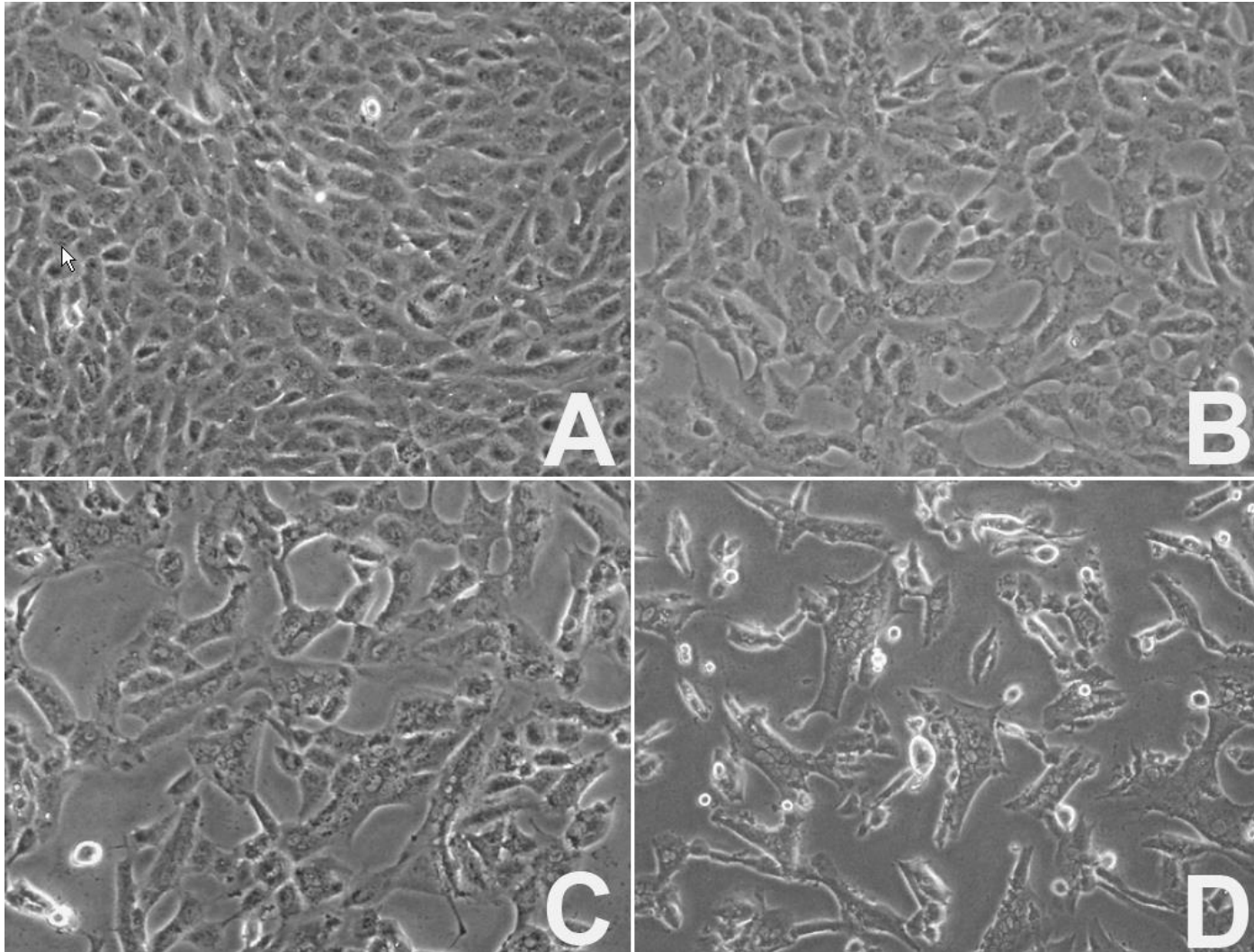
ECP Células Vero antes e após infecção com poliovírus tipo 1



Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

ECP em Células epiteliais antes e após infecção HSV-1 (0-8-12-24hs)



Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

Esta metodologia permite determinar:

A dose infecciosa (**TCID₅₀**) ou letal para um determinado vírus (**LD₅₀**)

Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

Virus dilution		Cytopathic effect								
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Endpoint: Dose infecciosa (**ID₅₀**), diluição na que 50 % das culturas apresentam efeito citopático

tissue culture infectious dose (TCID₅₀, TCD₅₀)

Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

Letalidade de poliovírus

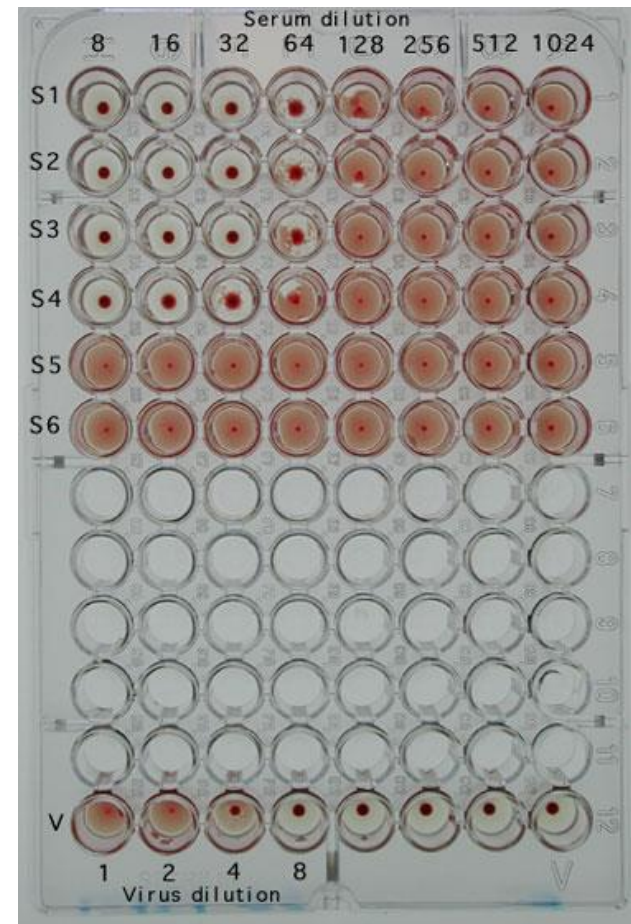
Dilution	Alive	Dead	Total alive	Total dead	Mortality ratio	Mortality (%)
1×10^{-2}	0	8	0	40	0/40	100
1×10^{-3}	0	8	0	32	0/32	100
1×10^{-4}	1	7	1	24	1/25	96
1×10^{-5}	0	8	1	17	1/18	94
1×10^{-6}	2	6	3	9	3/12	75
1×10^{-7}	5	3	8	3	8/11	27

Endpoint: Dose letal (**LD₅₀**), diluição na que 50 % dos animais morrem.

Métodos Baseados em Sorologia

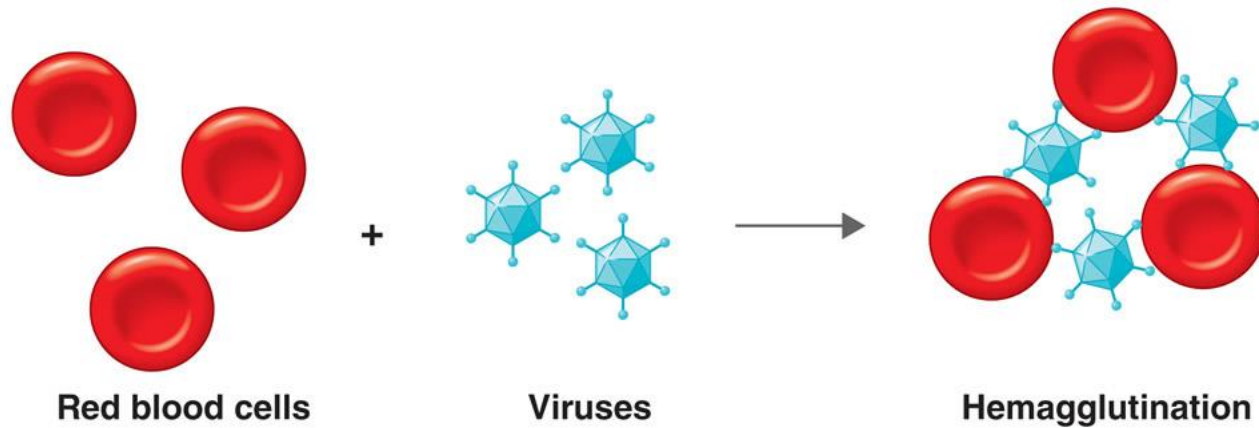
Métodos de diagnóstico rápido

- Reações de antígeno-anticorpo
- inibição da hemaglutinação
- fixação do complemento
- **ensaio imunoenzimático**
- aglutinação de partículas de látex



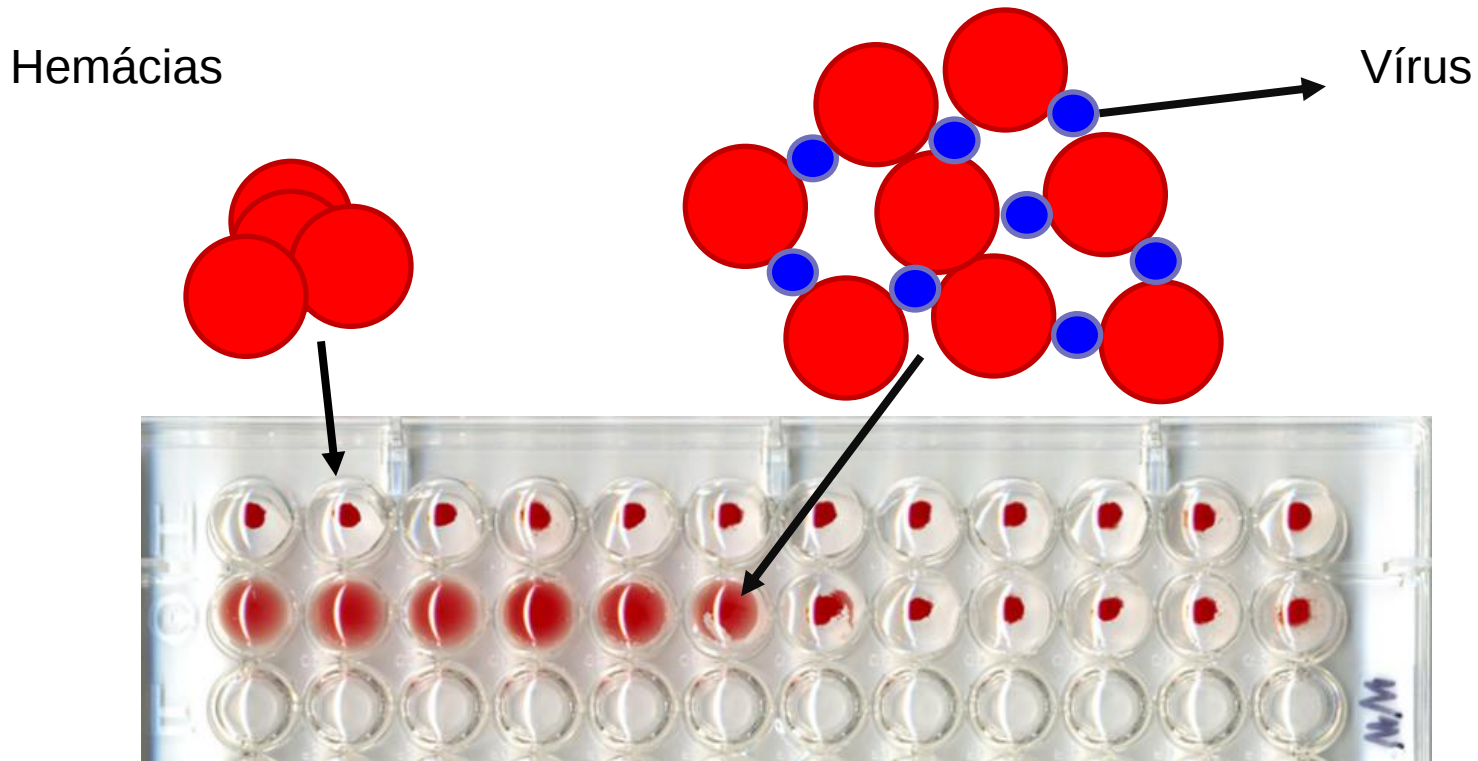
Estudo de Vírus

Ensaio de Hemaglutinação



Estudo de Vírus

Ensaio de Hemaglutinação



Ensaio rápido e barato. Permite determinar o título viral.

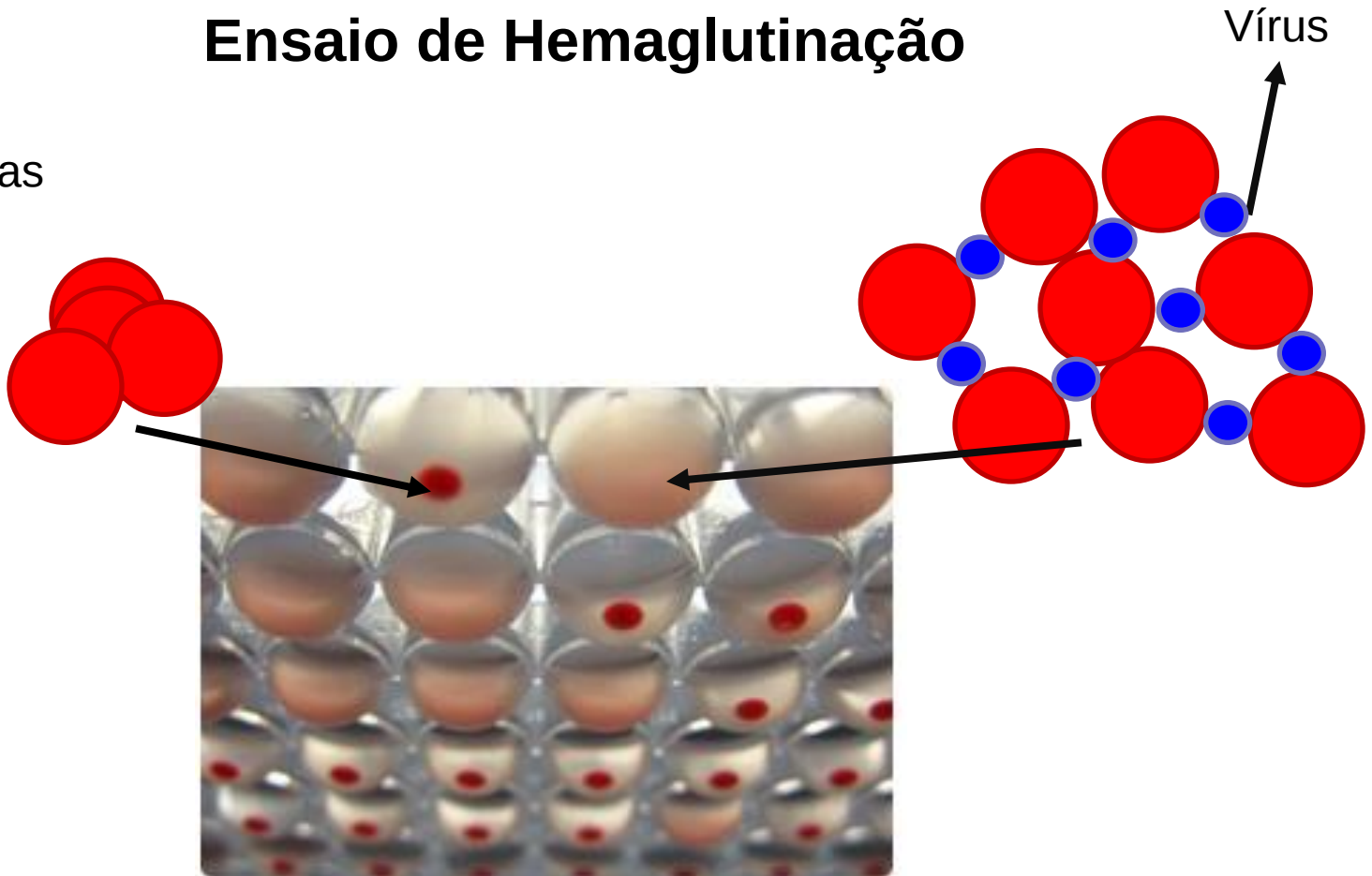
O ensaio de inibição da hemaglutinação permite determinar o tipo de vírus presente

Estudo de Vírus

Ensaio de Hemaglutinação

Hemácias

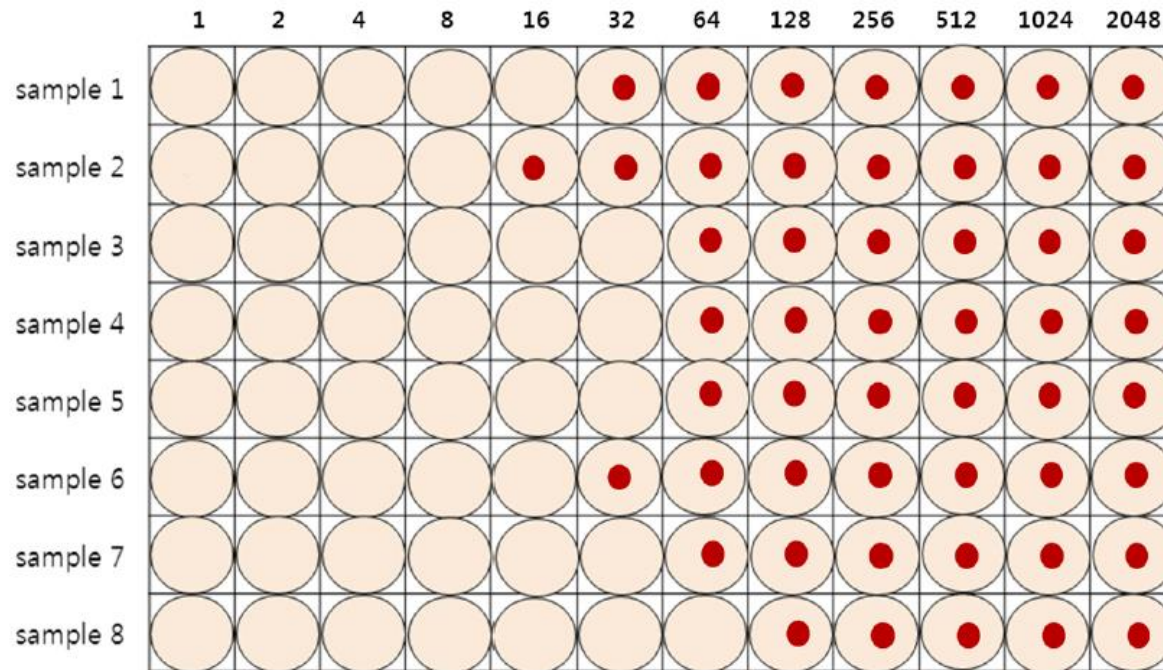
Vírus



Ensaio rápido e barato. Permite determinar o título viral.

Estudo de Vírus

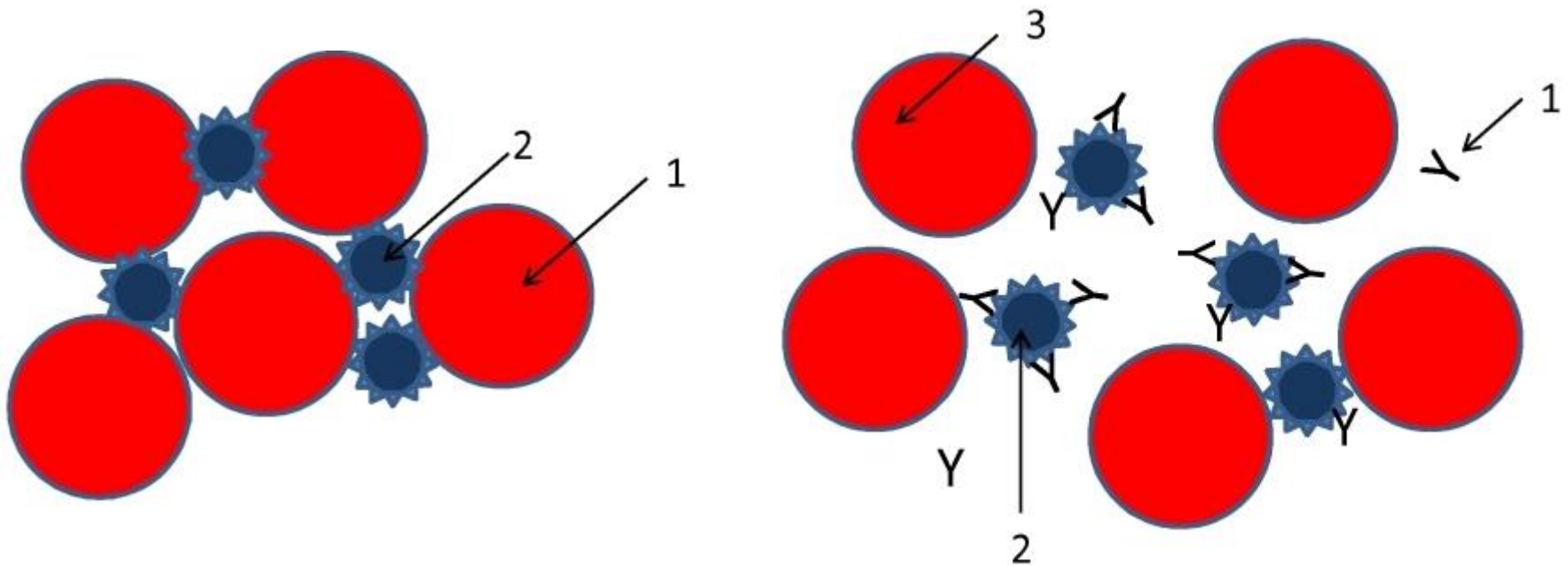
Ensaio de Hemaglutinação



HAU titer			
Sample1	16	Sample5	32
Sample2	8	Sample6	16
Sample3	32	Sample7	32
Sample4	32	Sample8	64

Estudo de Vírus

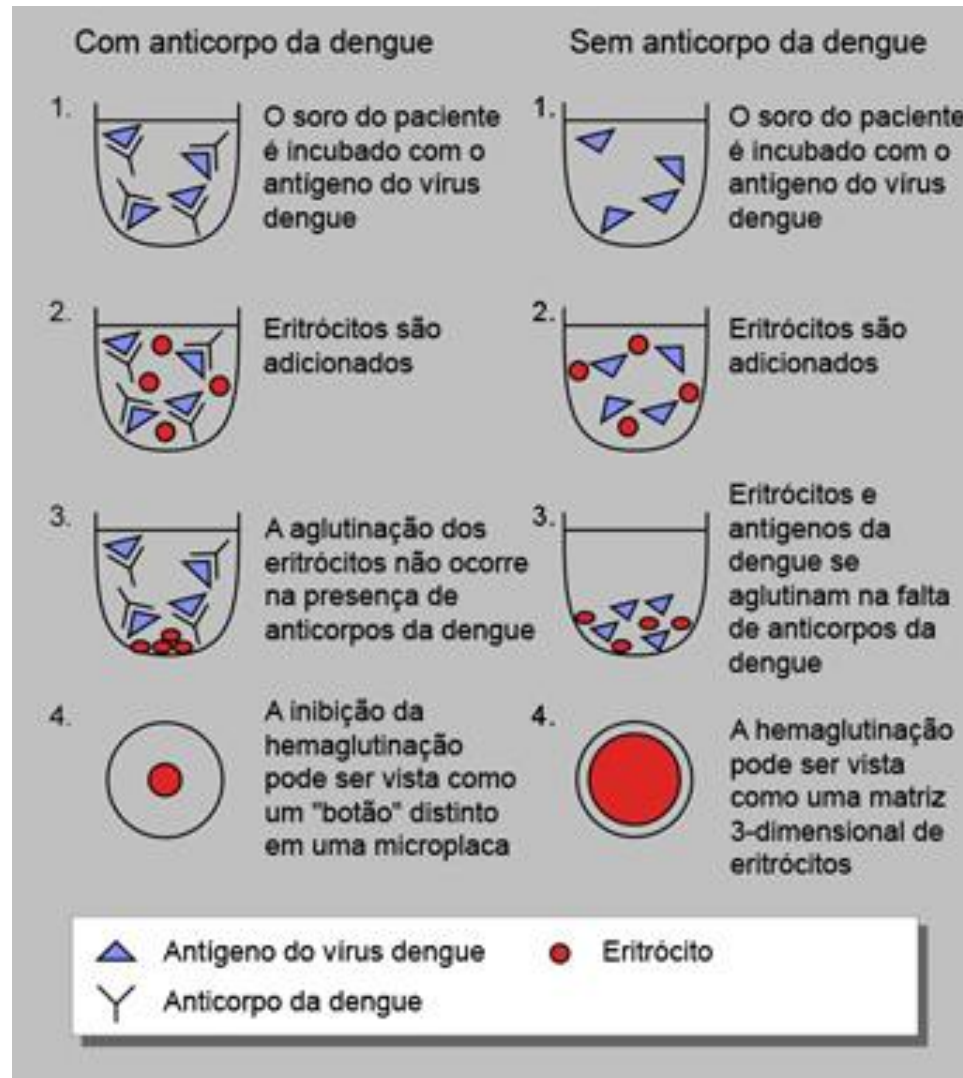
Ensaio de Inibição da Hemaglutinação



Ensaio rápido e barato. Permite determinar o tipo de vírus presente

Estudo de Vírus

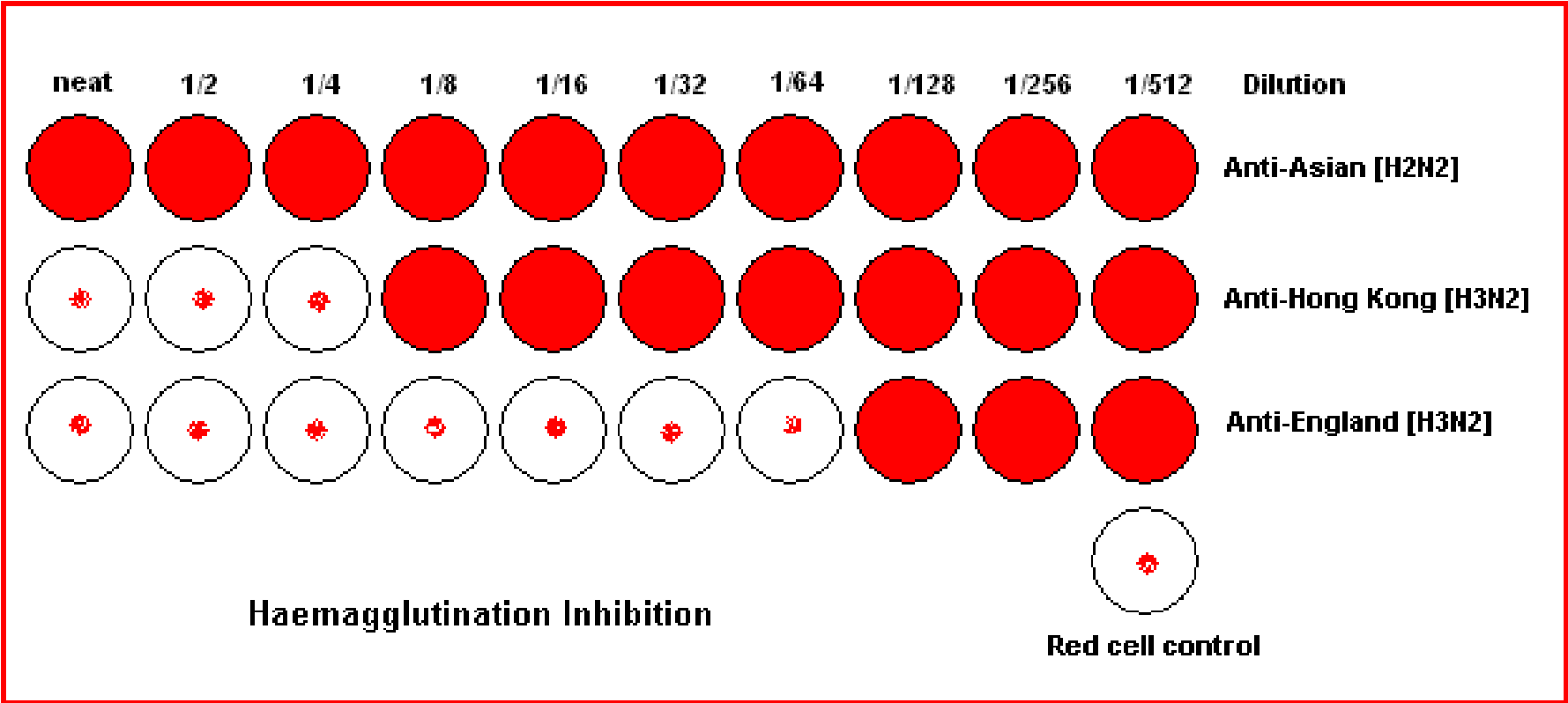
Ensaio de Inibição da Hemaglutinação



Ensaio rápido e barato. Permite determinar o tipo de vírus presente

Estudo de Vírus

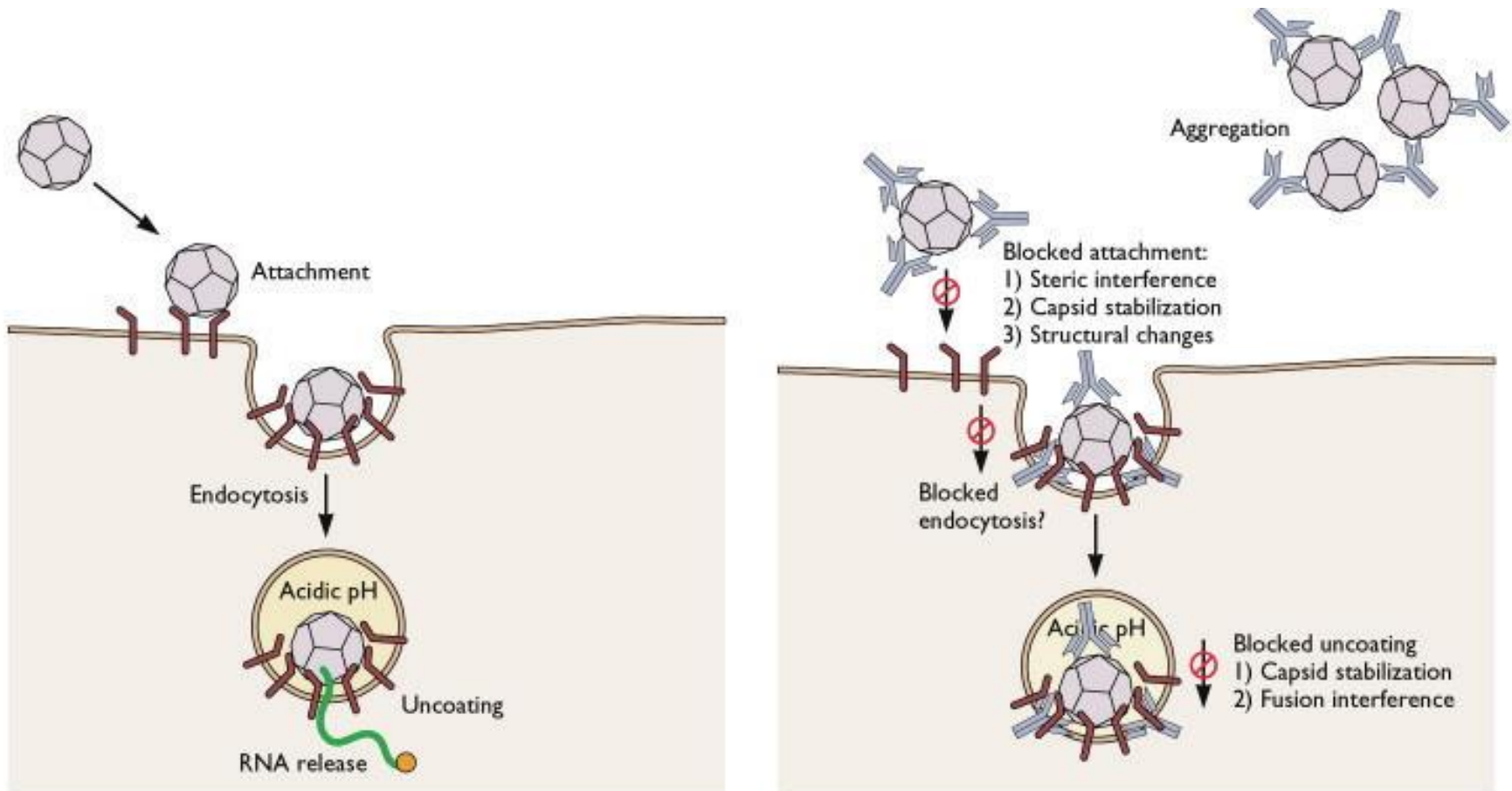
Ensaio de Inibição da Hemaglutinação



Ensaio rápido e barato. Permite determinar o tipo de vírus presente

Estudo de Vírus

Método de Neutralização de vírus



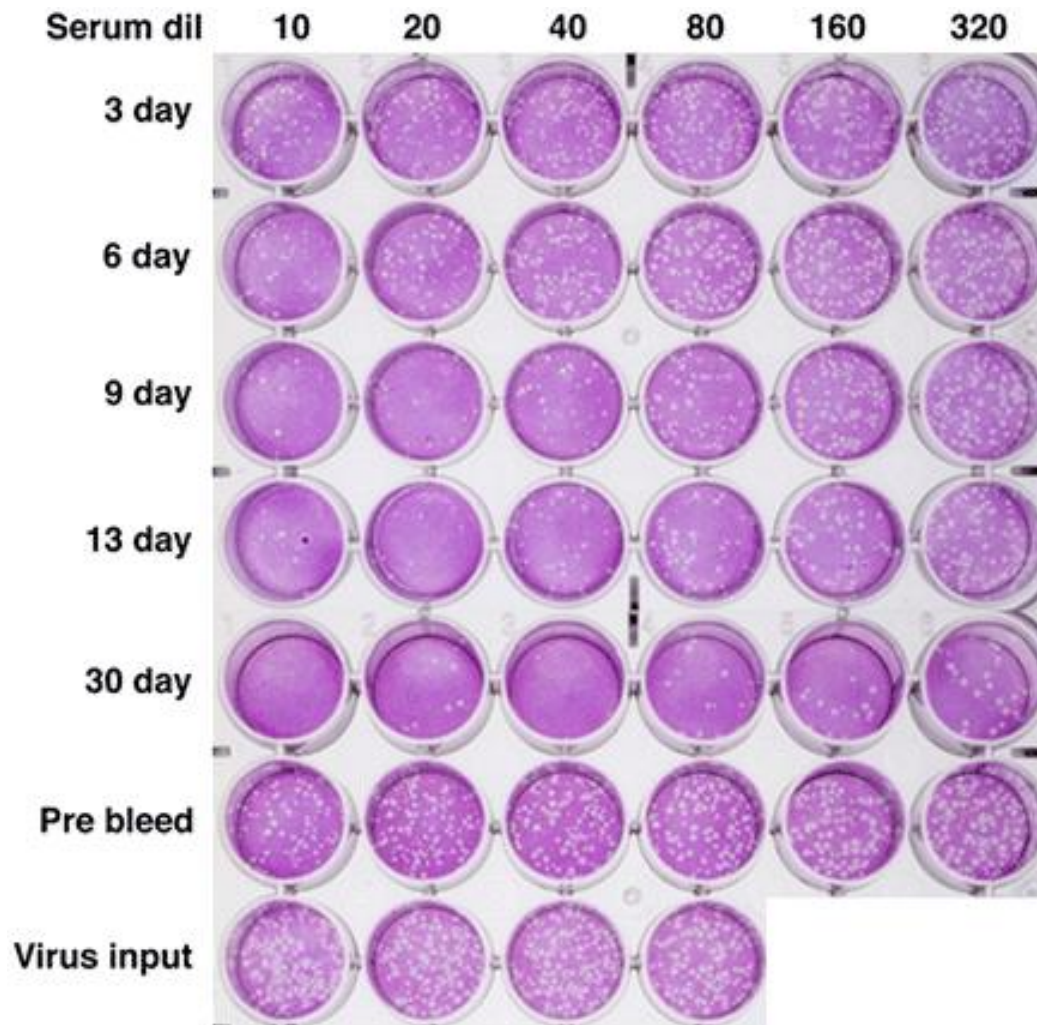
- Baseado na presença de anticorpos neutralizantes

Estudo de Vírus

Método de Neutralização de vírus

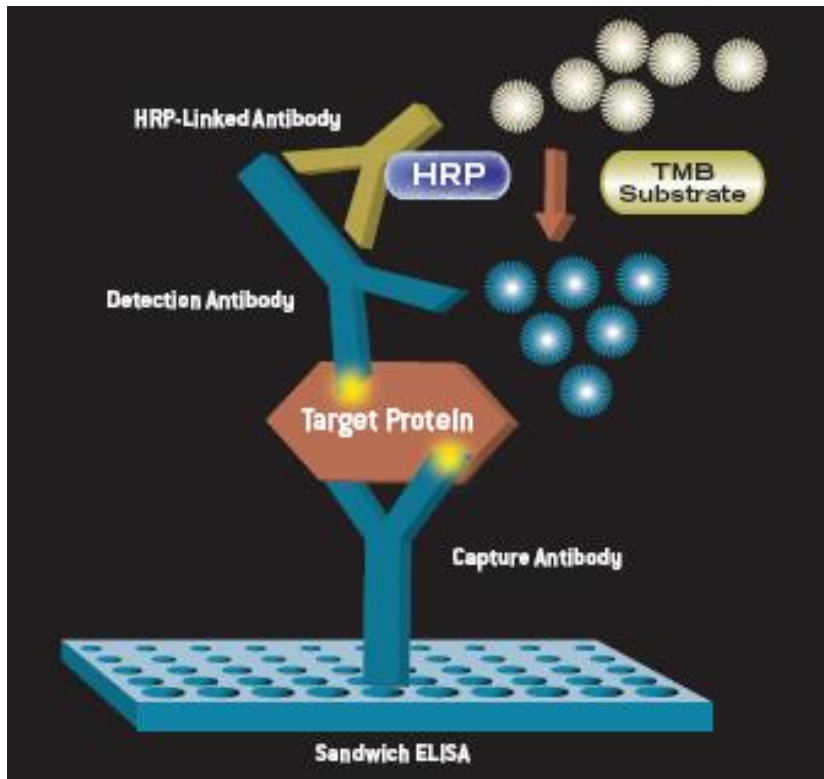
Cinética da neutralização do vírus vaccinia

Cinética da neutralização do vírus vaccinia



Estudo de Vírus

Ensaio baseados em anticorpos (RIA, EIA, ELISA)



RIA – radio imuno ensaio

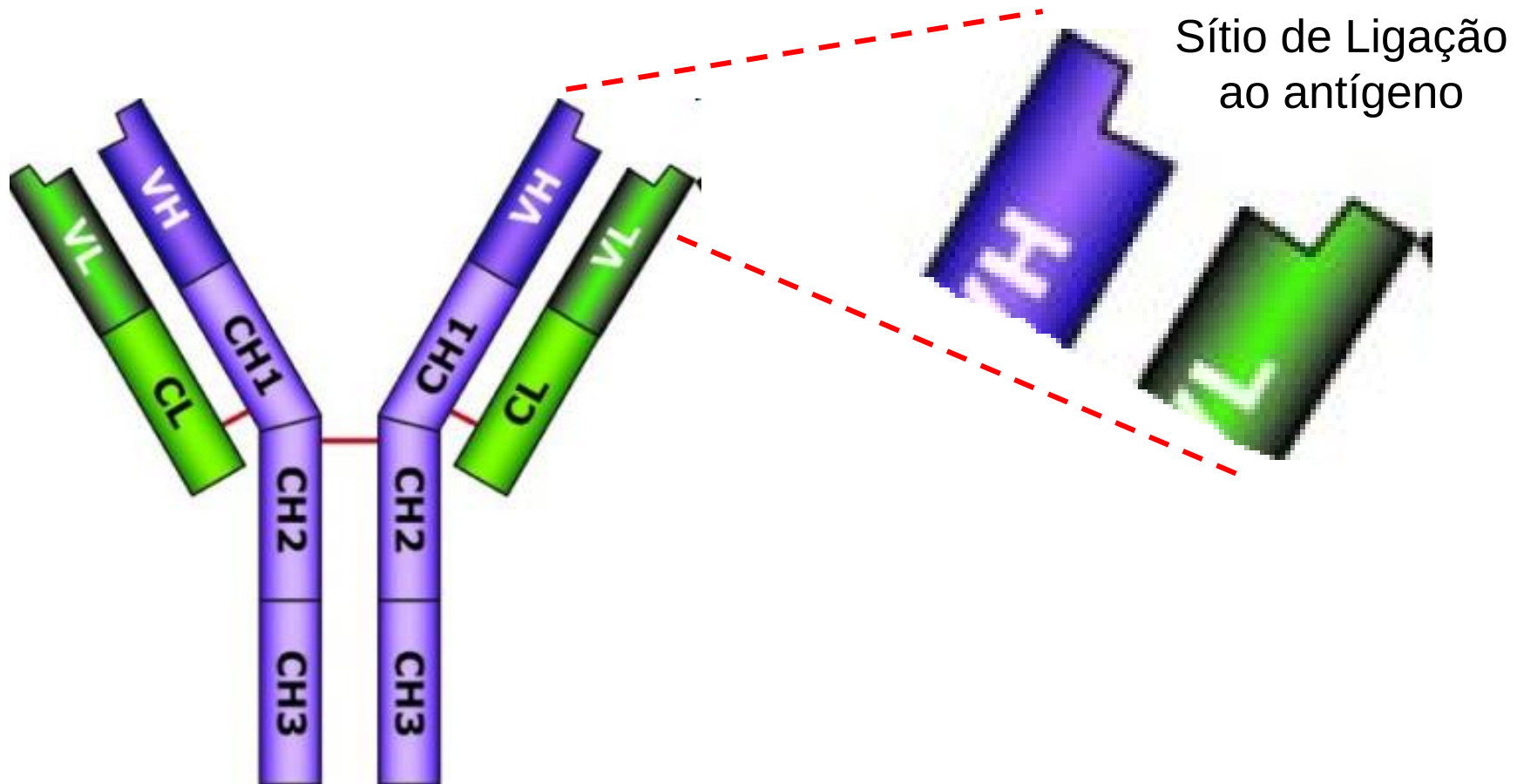
EIA – enzima imuno ensaio

ELISA – enzyme-linked immunosorbed assay

- Permitem detectar antígenos virais presentes em amostras (ex. secreções nasais)
- Permitem automação.

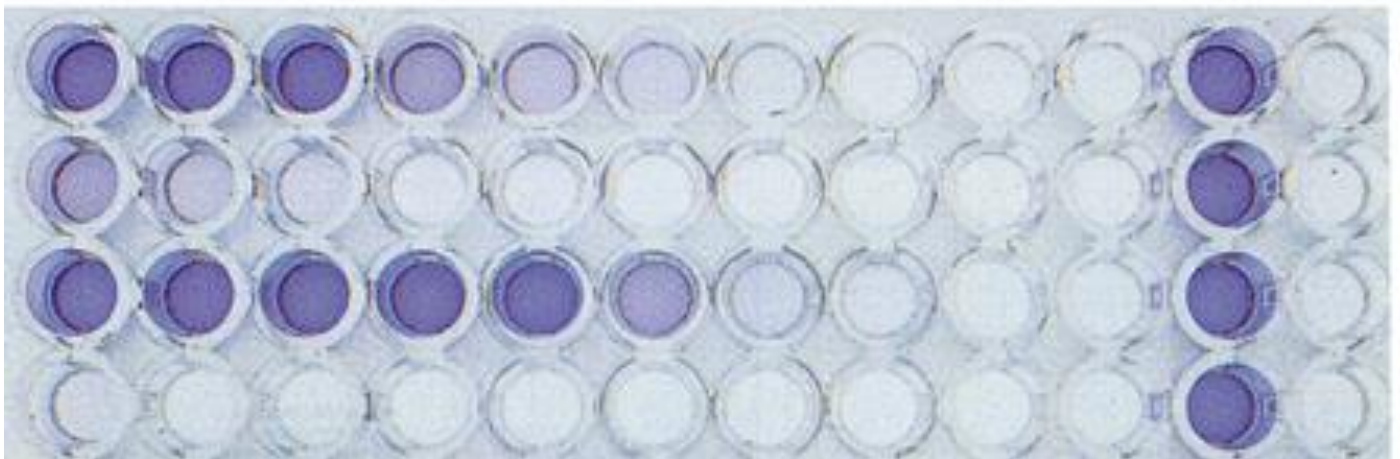
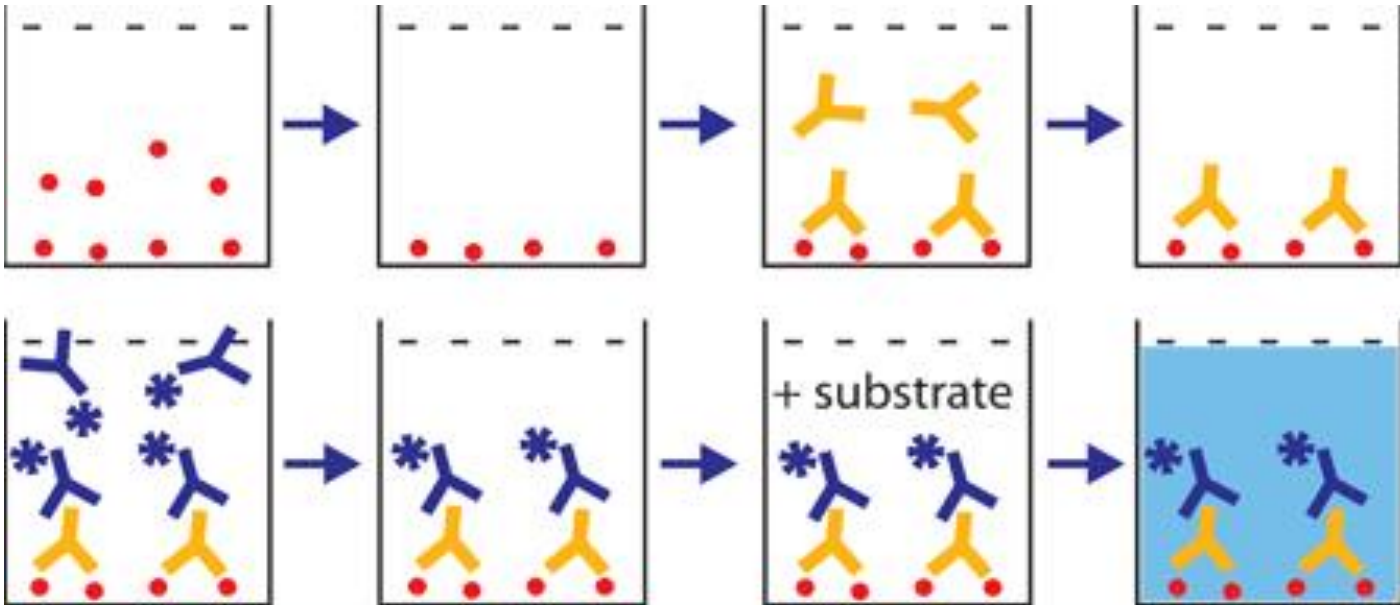
Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos



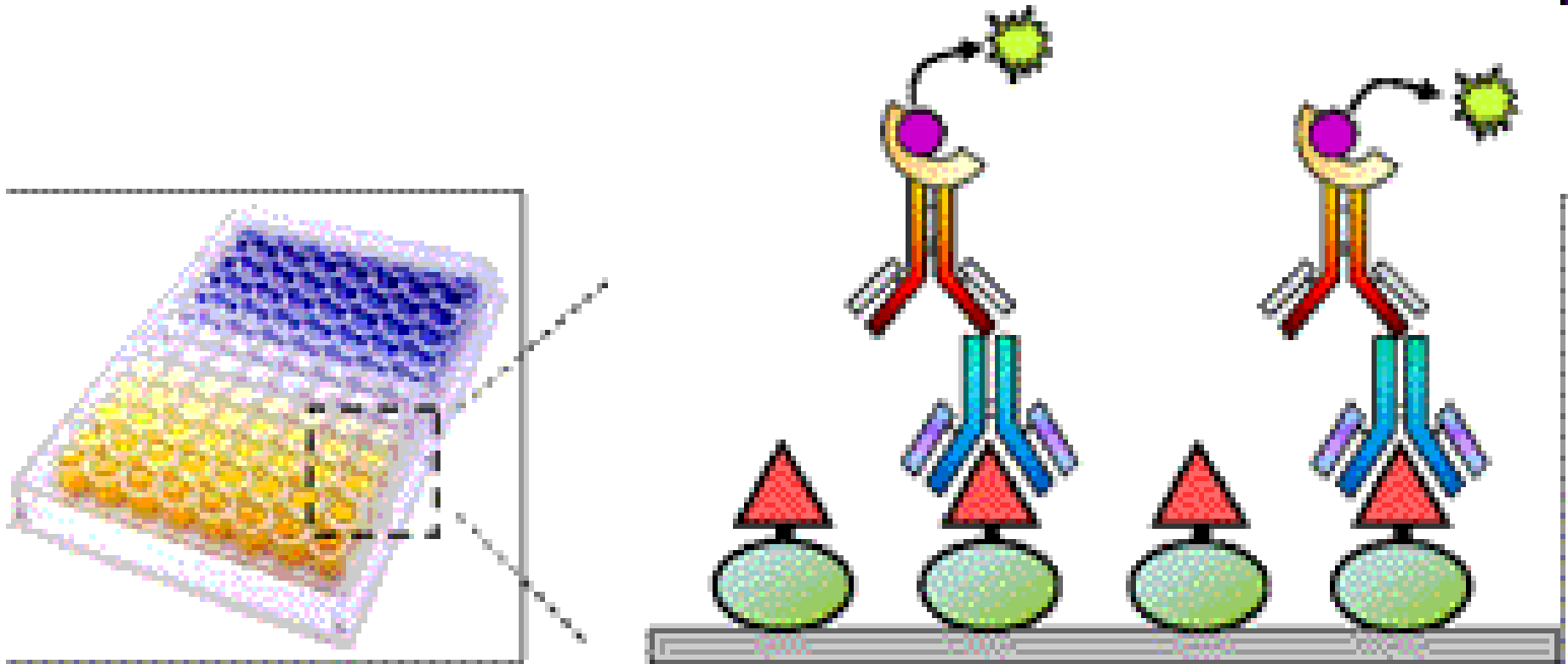
Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos (RIA, EIA, ELISA)



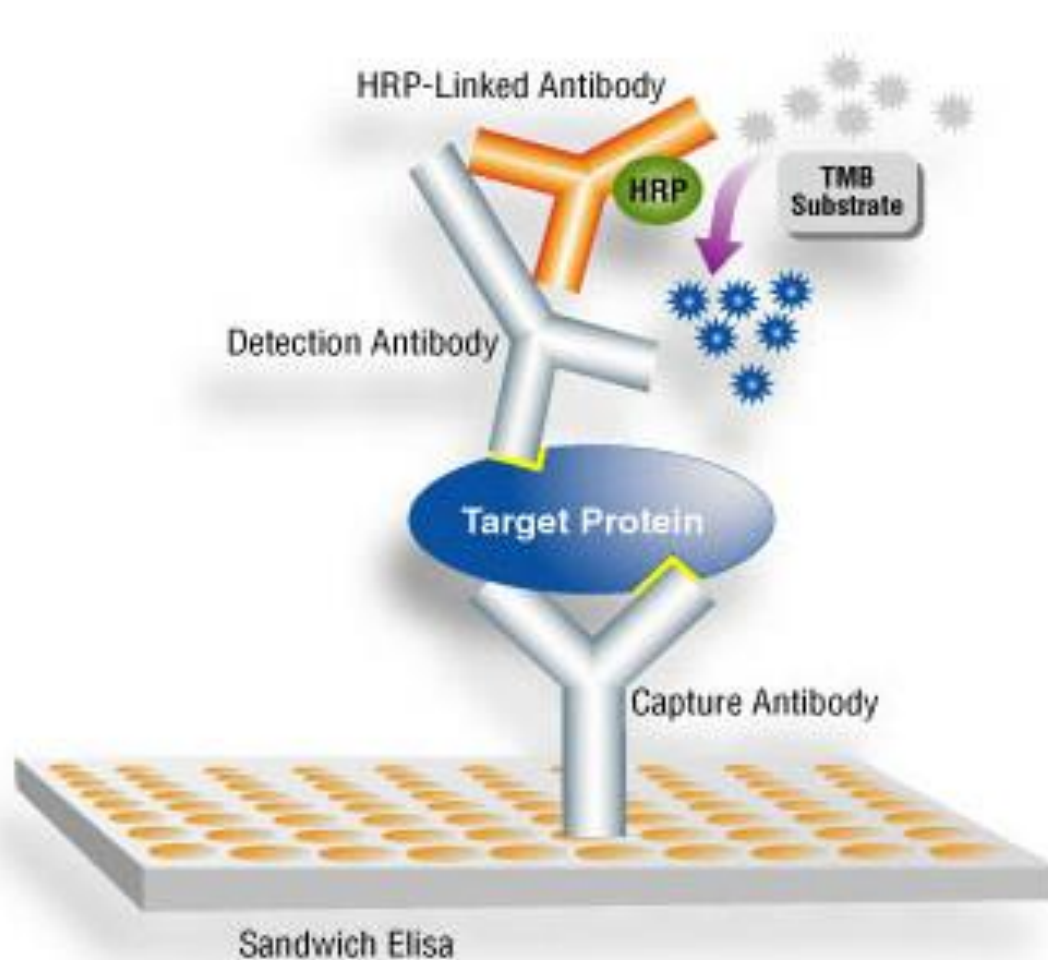
Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos (ELISA)



Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos (ELISA)



Métodos Moleculares

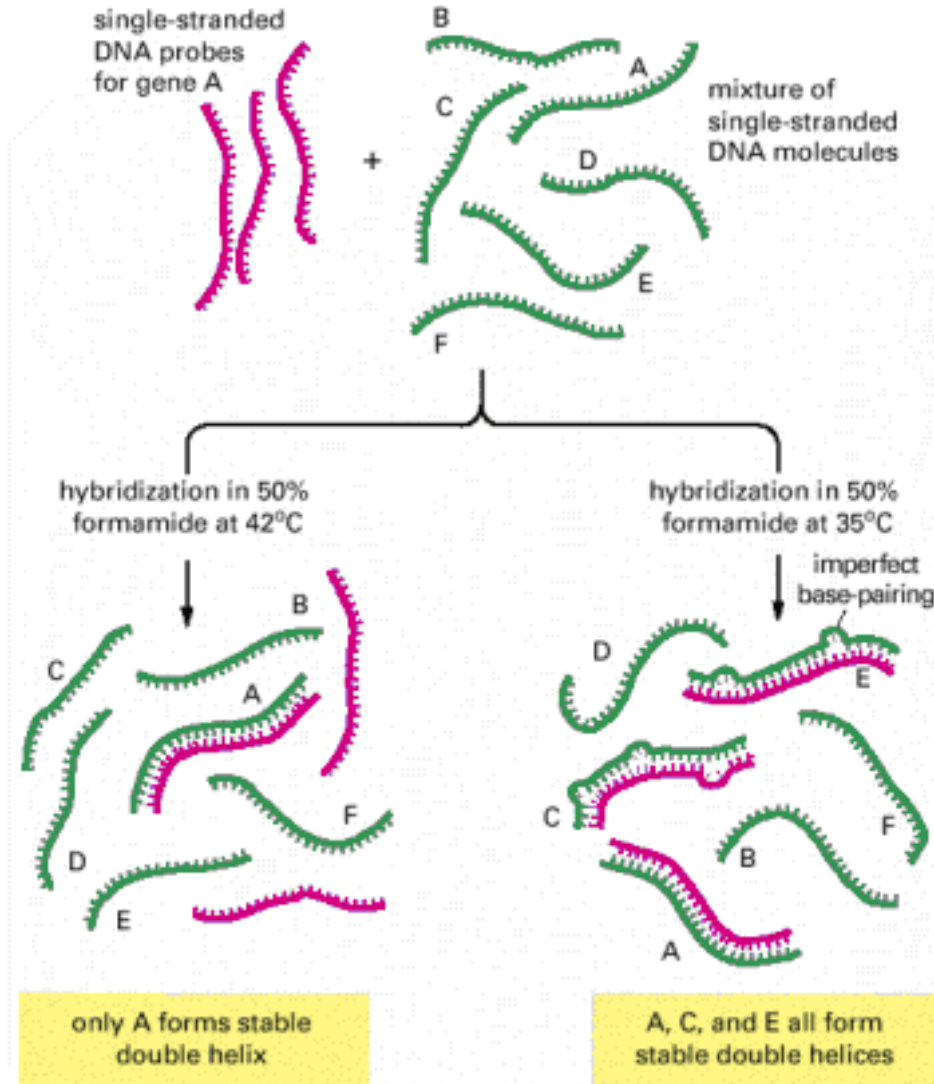
Estudo de Vírus

Os métodos moleculares analisam as macromoléculas virais isoladas ou no contexto tecidual.

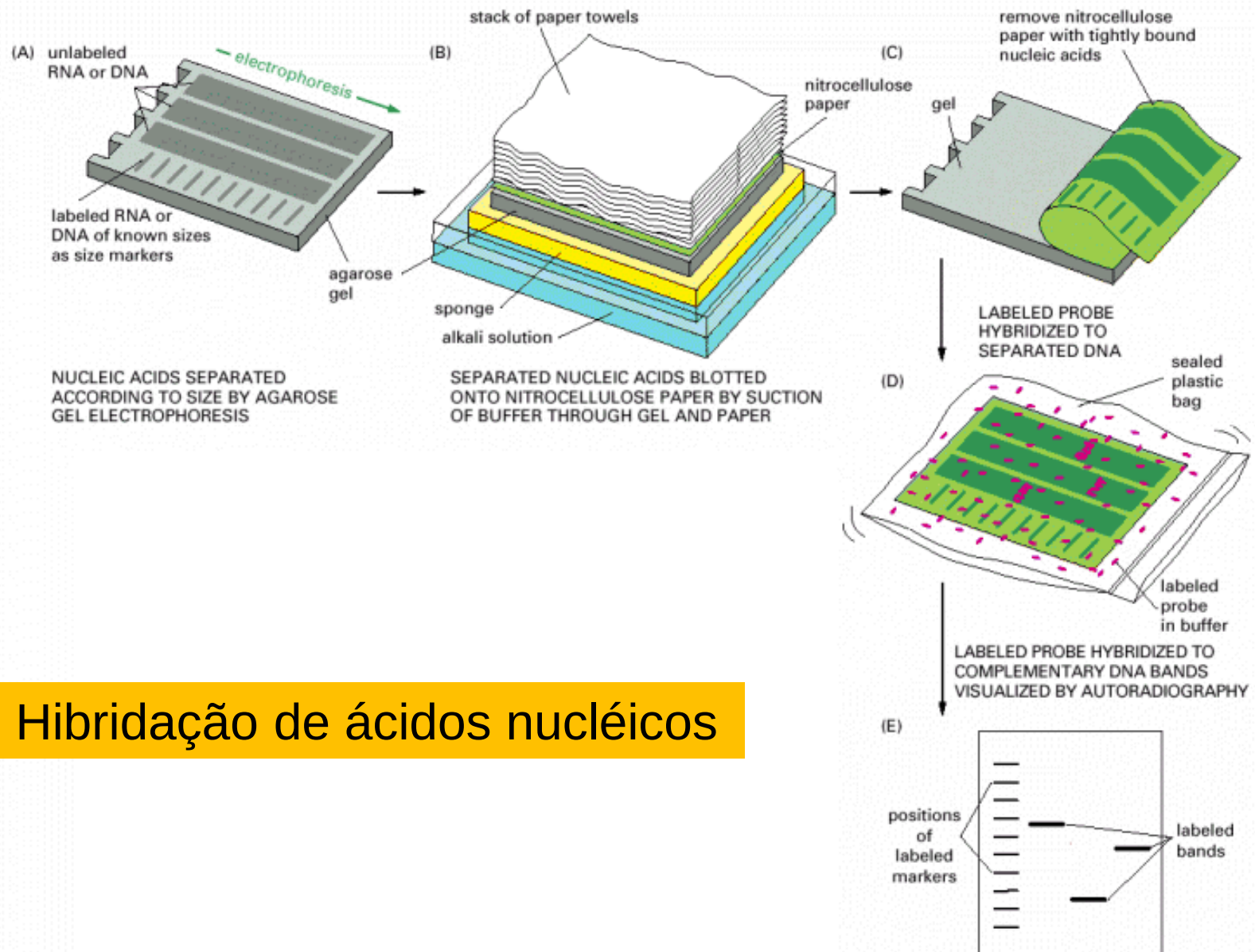
- Análise de Ácidos nucleicos.
- Análise de Proteínas.

Estudo de Vírus

Hibridação de ácidos nucleicos



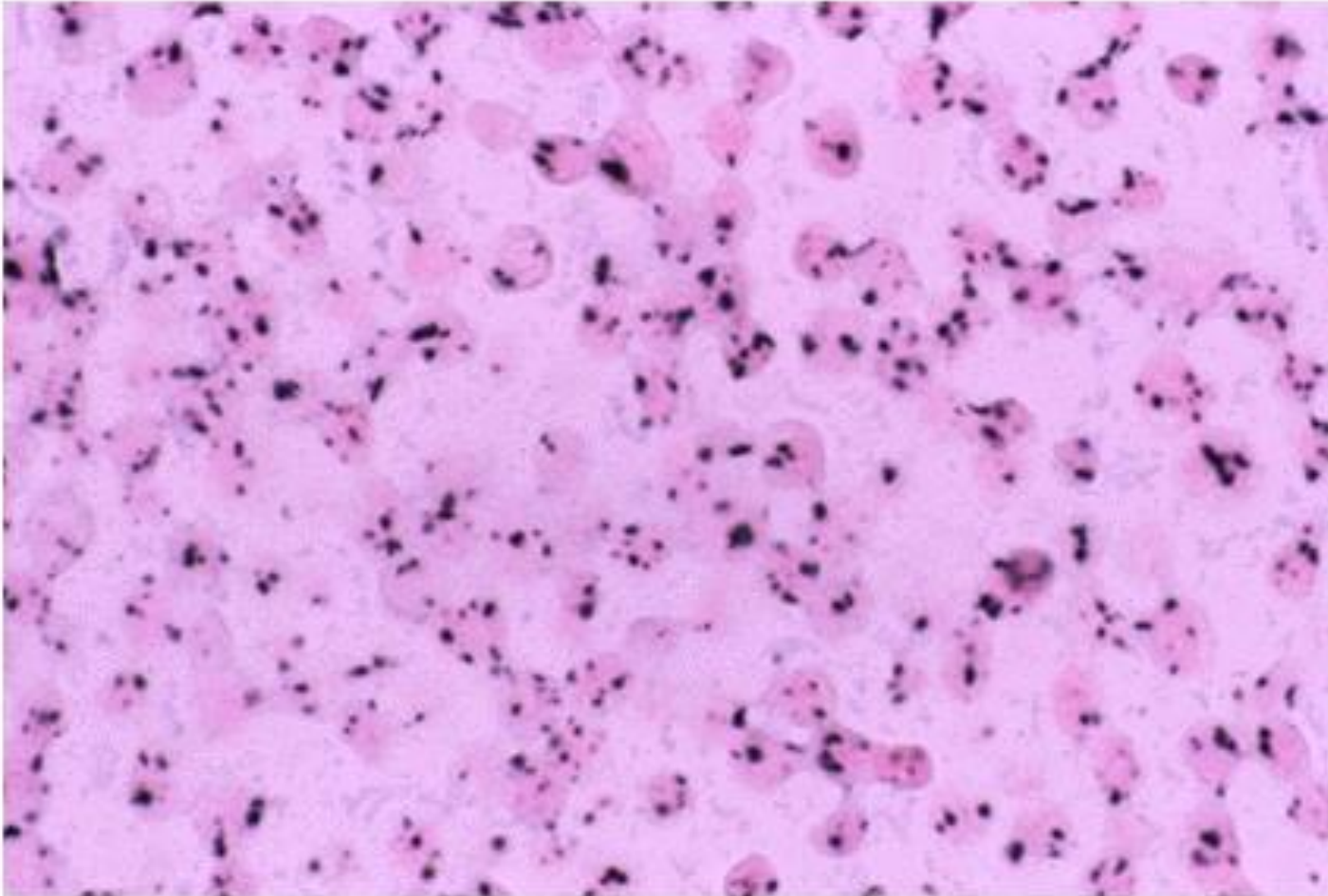
Estudo de Vírus



Hibridação de ácidos nucleicos

Estudo de Vírus

Hibridação de ácidos nucleicos

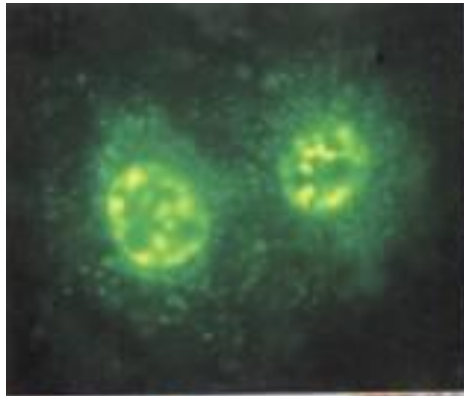


Detecção de HPV16 em células SiHa

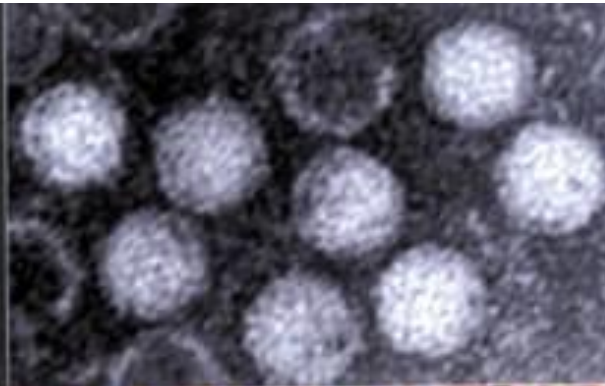
Estudo de Vírus

Hibridação de ácidos nucleicos

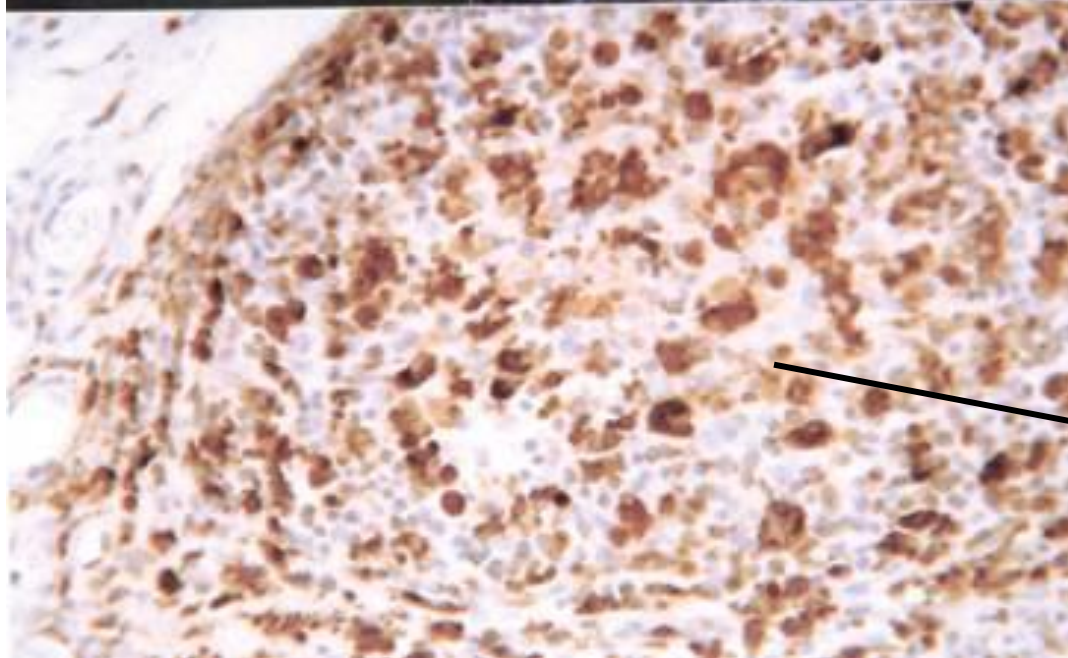
IF



EM



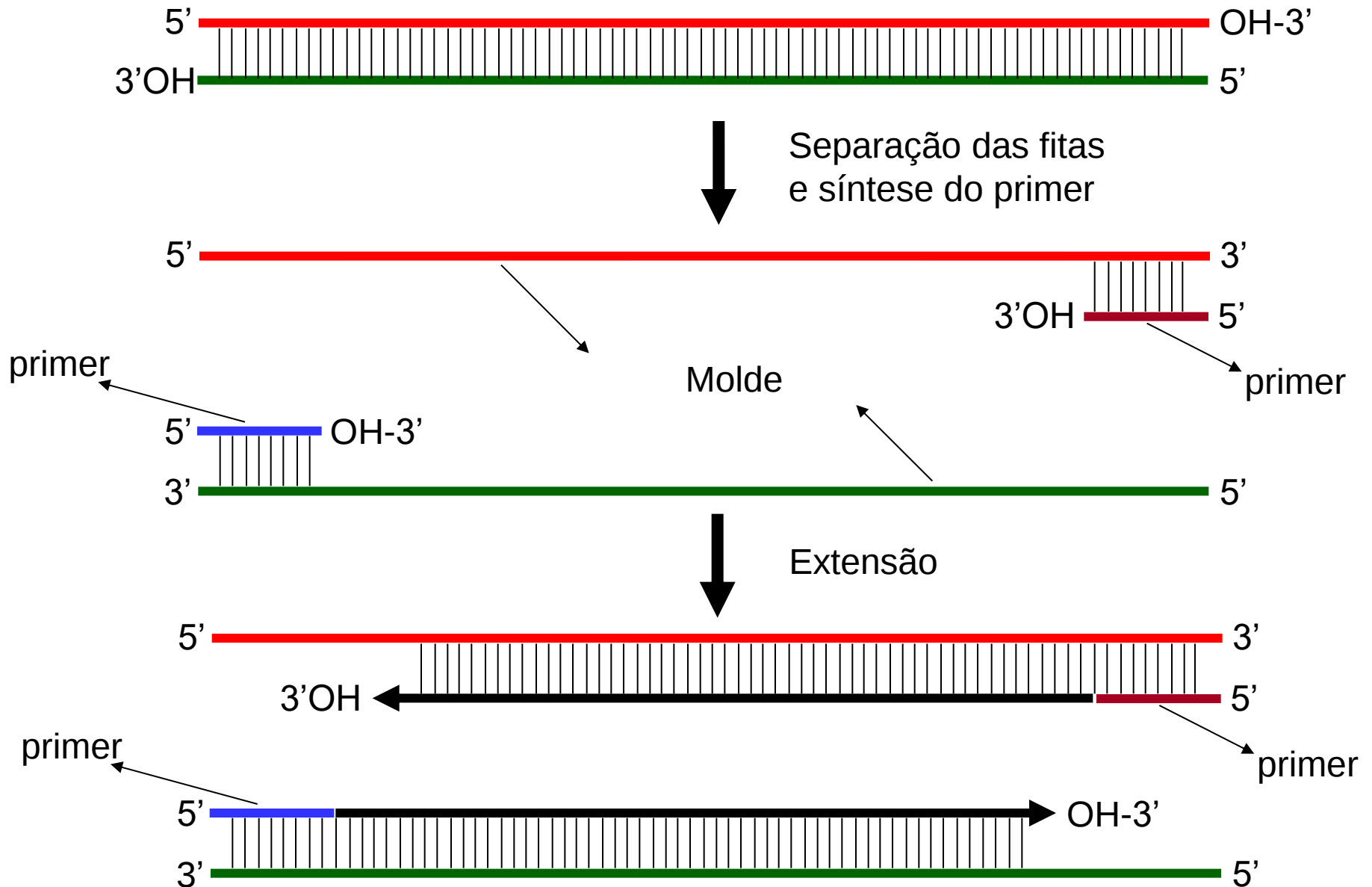
Coronavírus
tipo 2 em
porcos



ISH

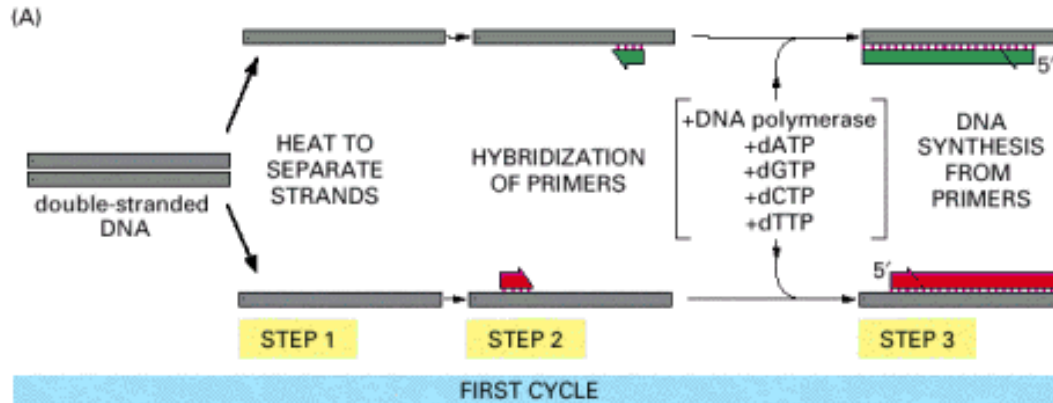
Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos

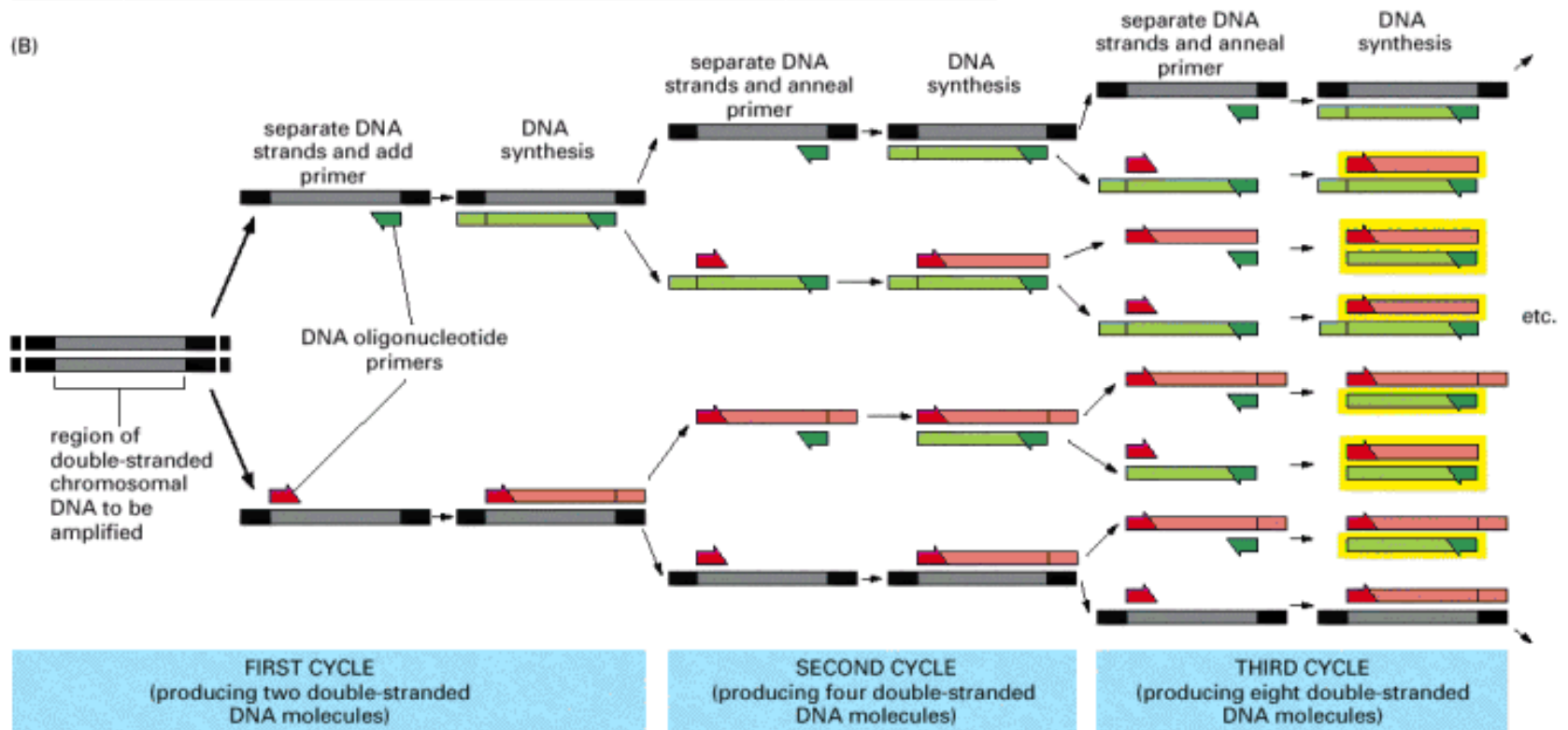


Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos



Reação em cadeia da polimerase



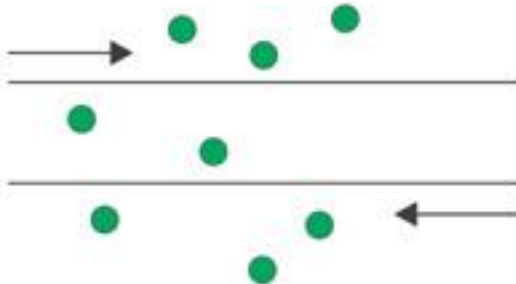
Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos

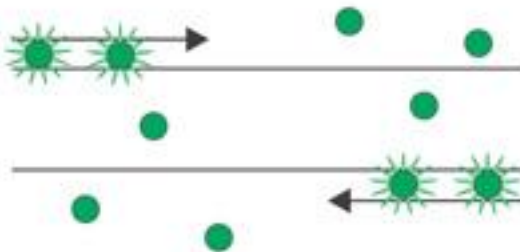
PCR em tempo real

a SYBR Green I

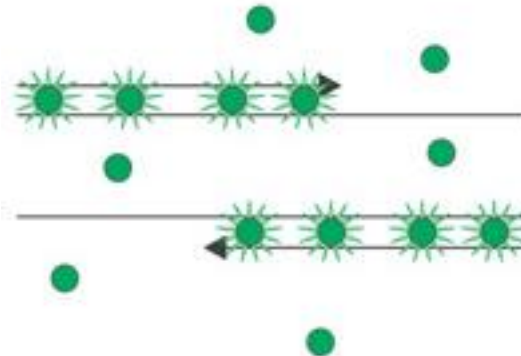
Annealing phase



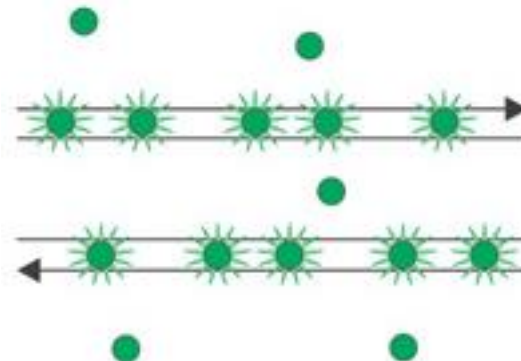
Extension phase (I)



Extension phase (II)



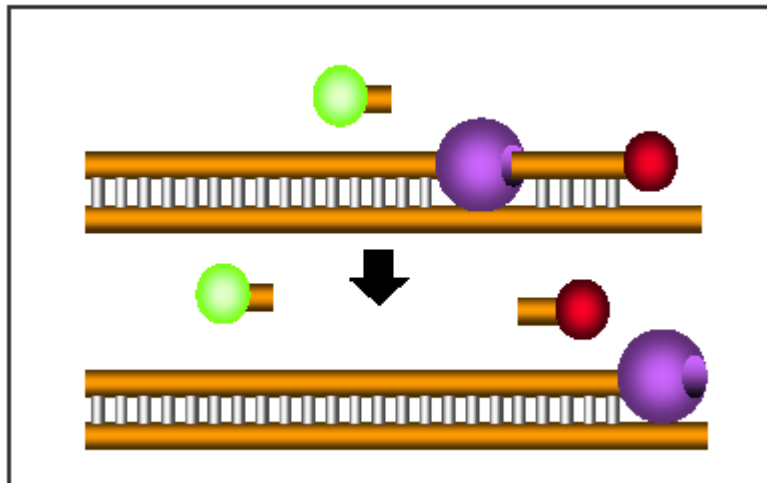
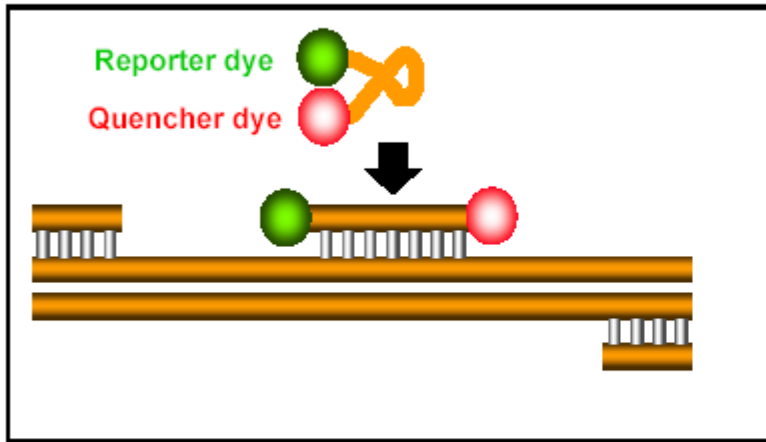
End of PCR cycle



Estudo de Vírus

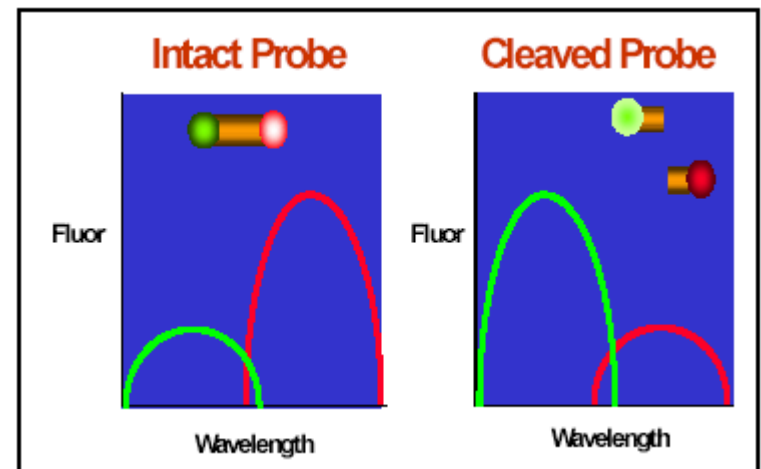
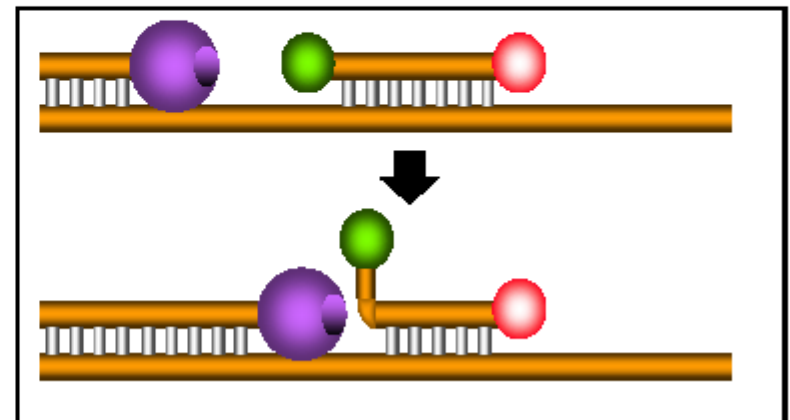
Amplificação de ácidos nucleicos

Figure 12: The 5' Nuclease Assay



PCR em tempo real

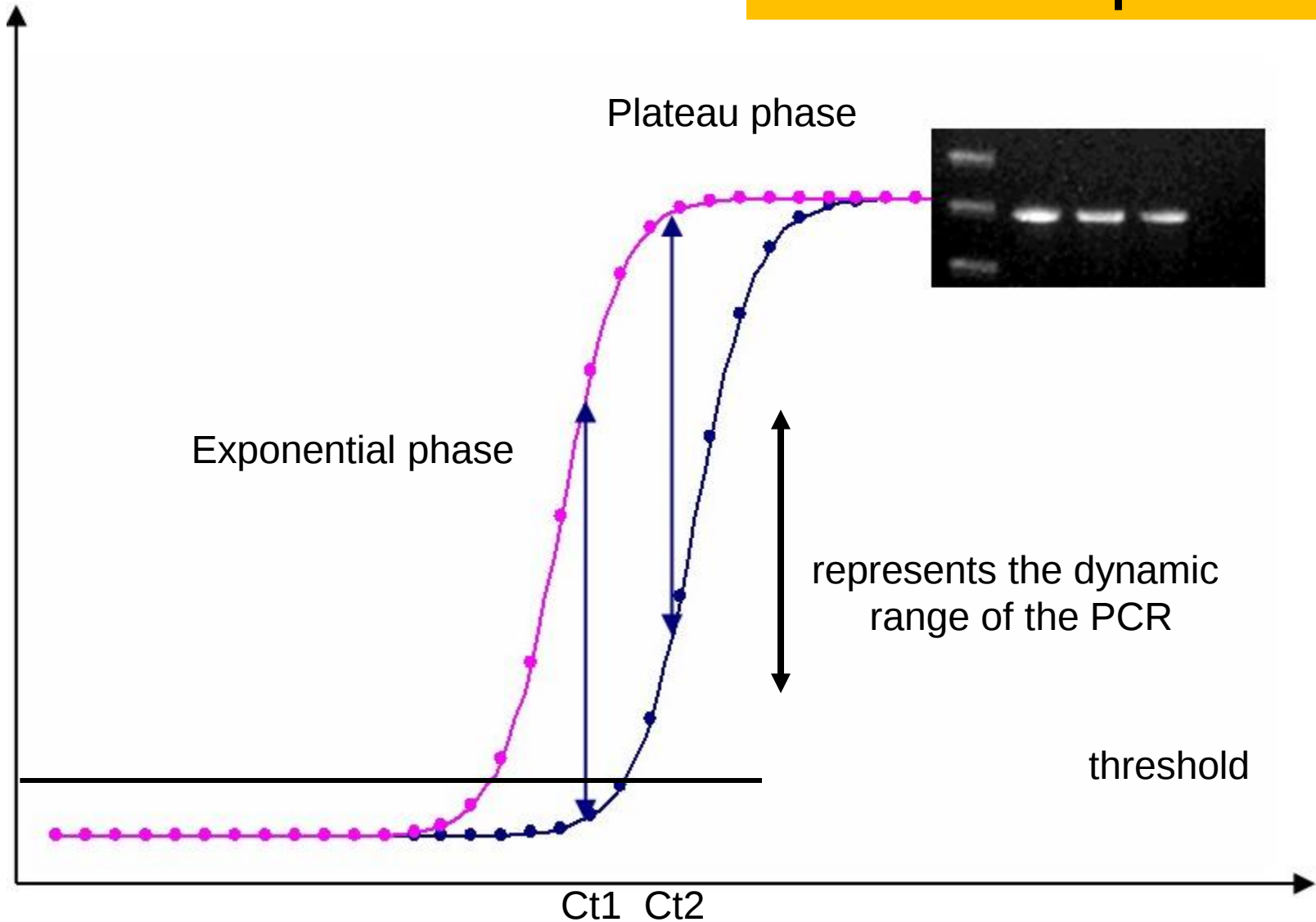
Figure 13: Polymerase collides with TaqMan® Probe



Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos

PCR em tempo real



Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos

PCR em tempo real

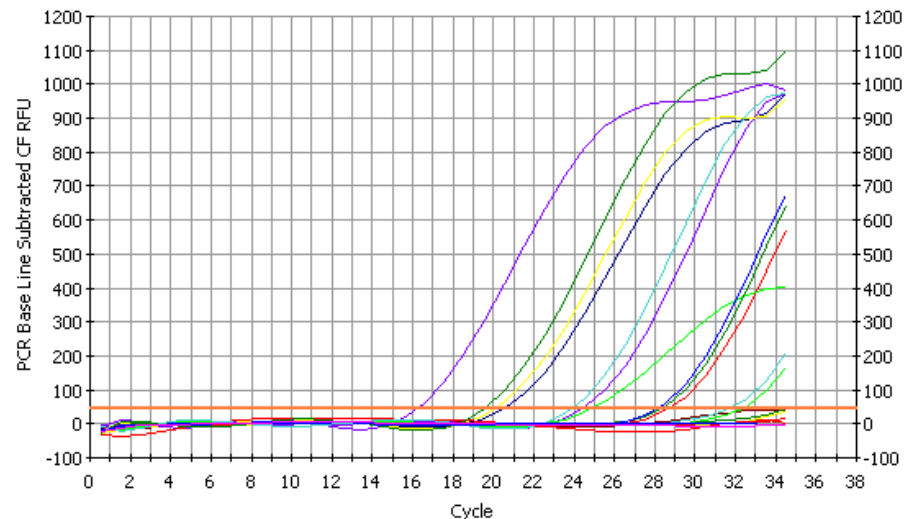
Amplificação e quantificação de sequências gênicas específicas

Vantagens

- rápido
- detecção de vírus não cultiváveis
- alta sensibilidade
- boa especificidade
- não contamina
- quantifica – medida de carga viral

Desvantagens

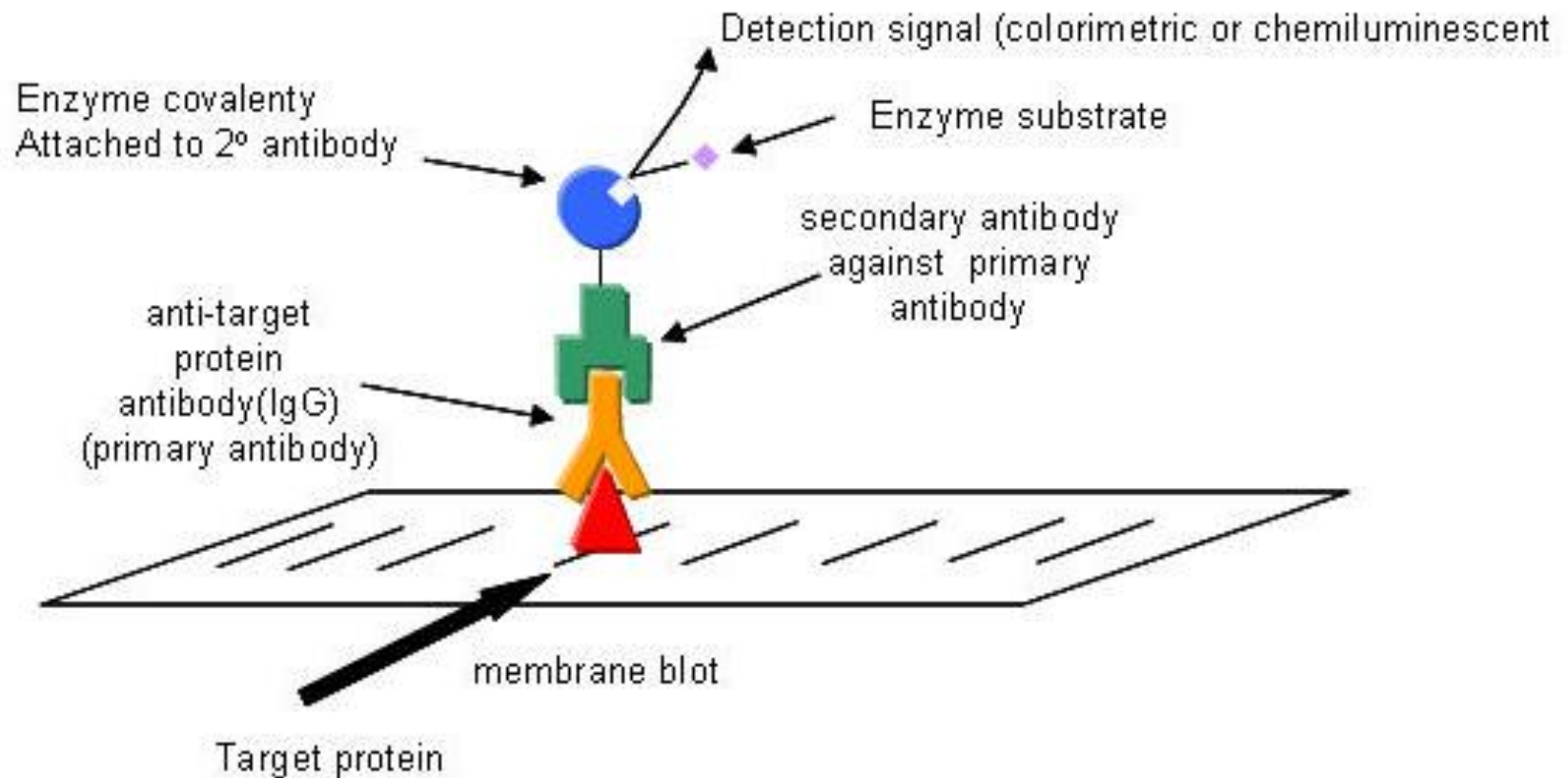
- nem sempre disponível – caro
- Padronização delicada



Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

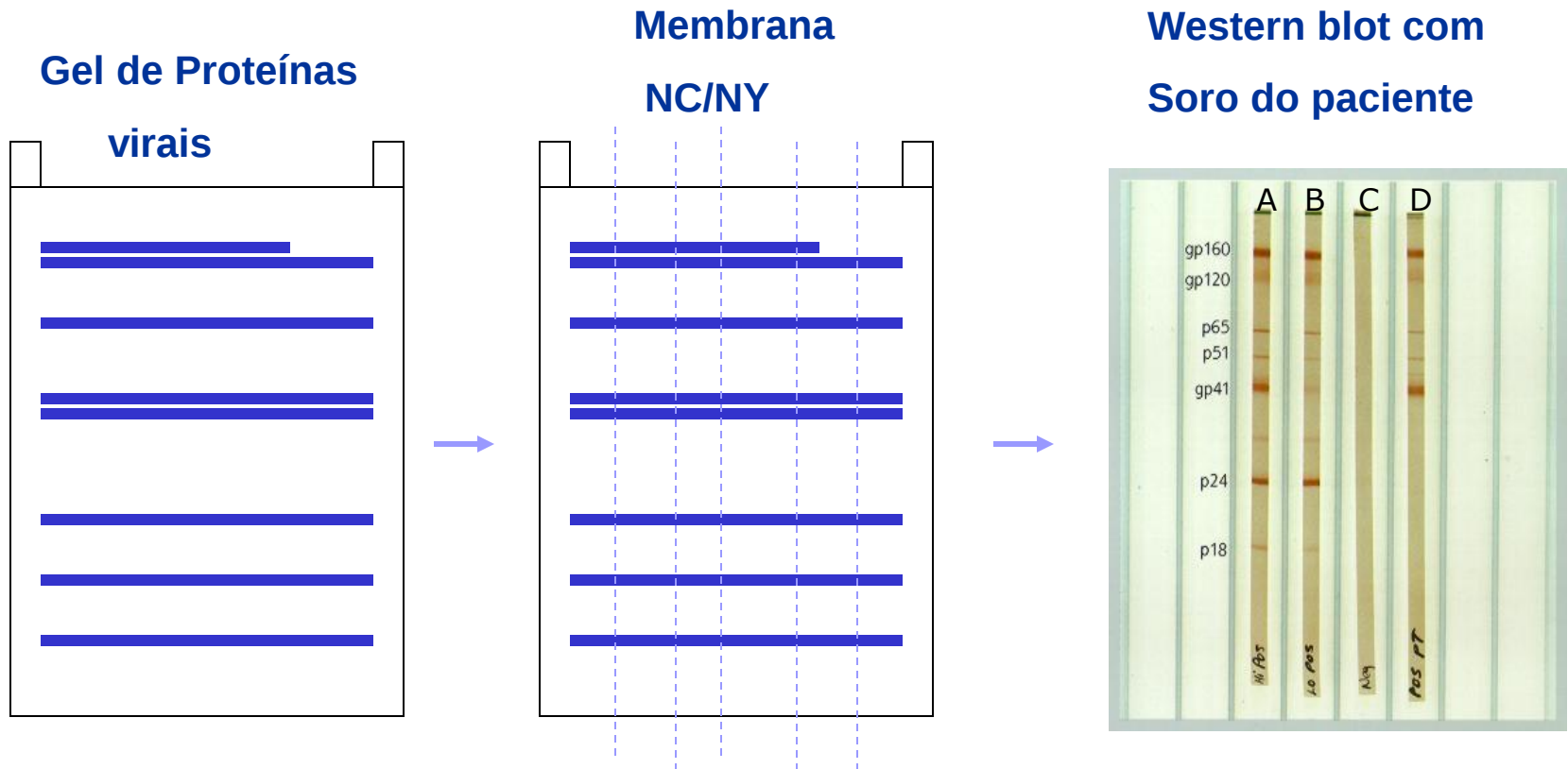
Western blot



Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

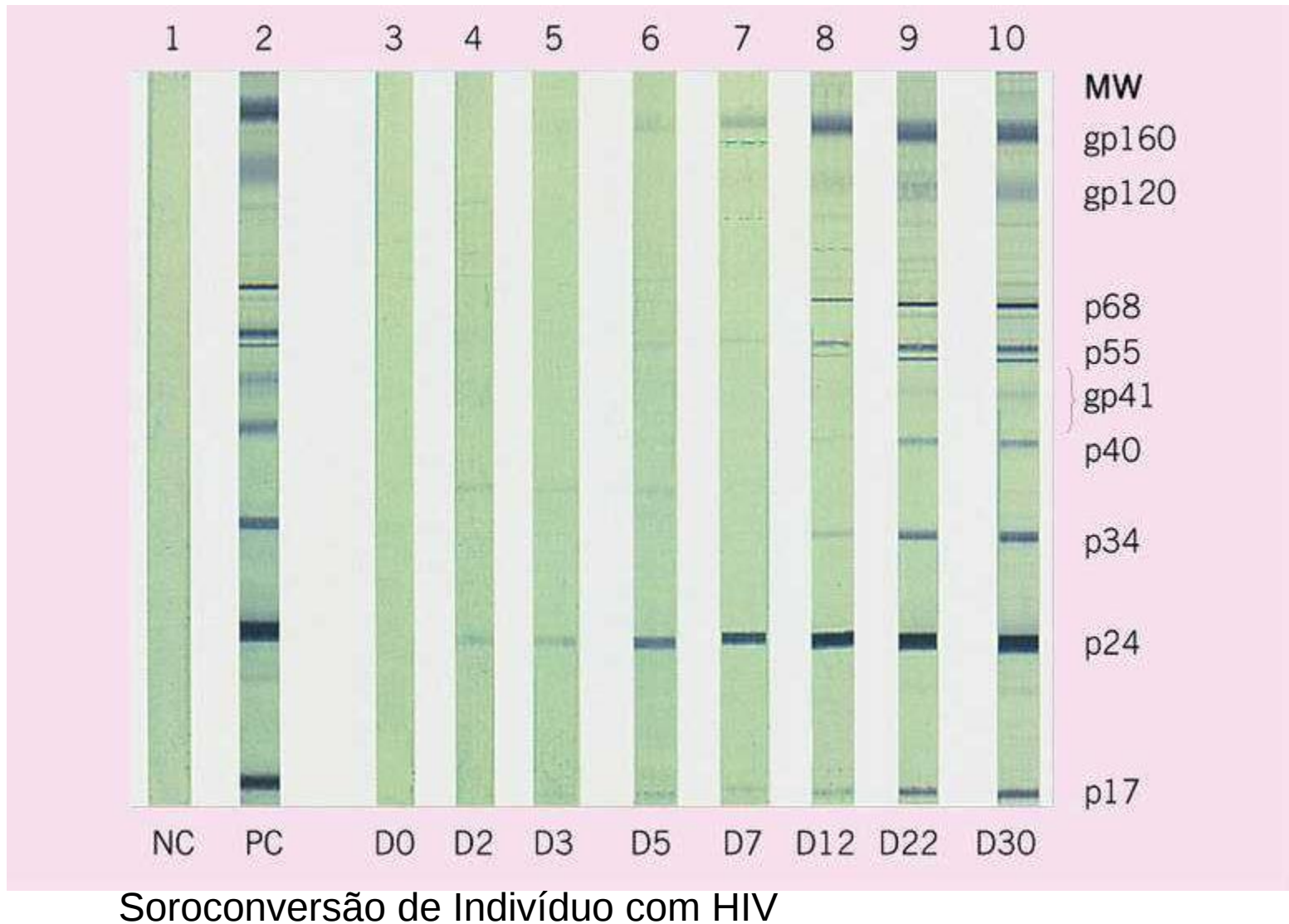
Western blot



Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

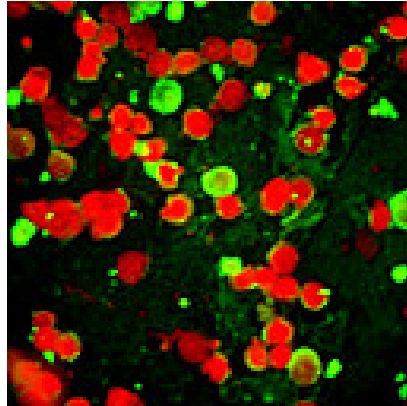
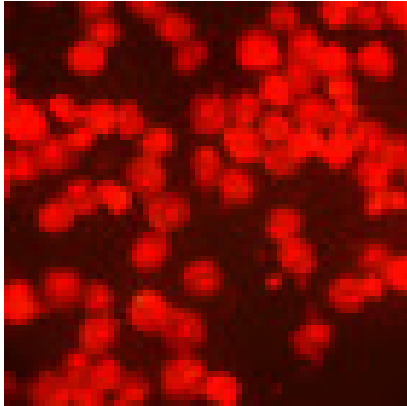
Western blot



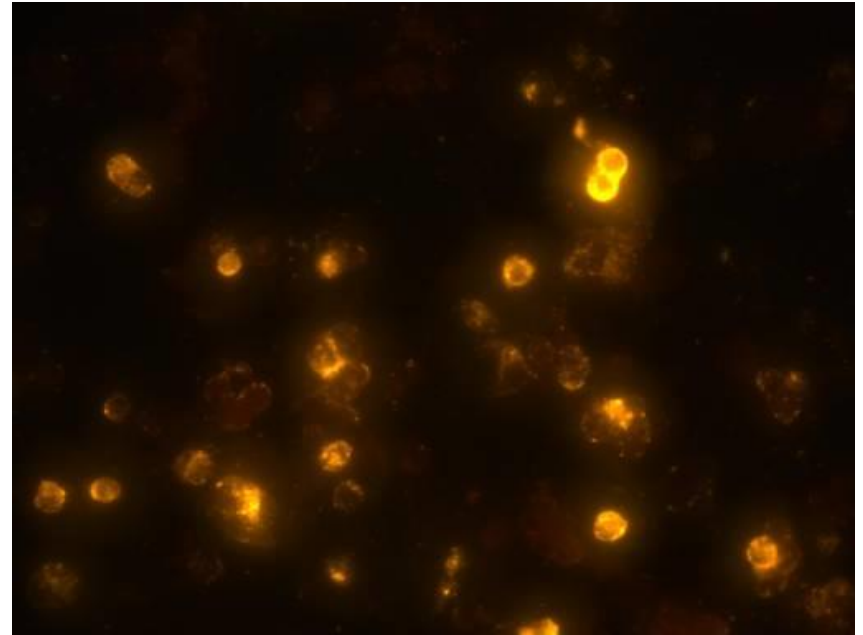
Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

Ensaio Imunofluorescência



VRS



Influenza A

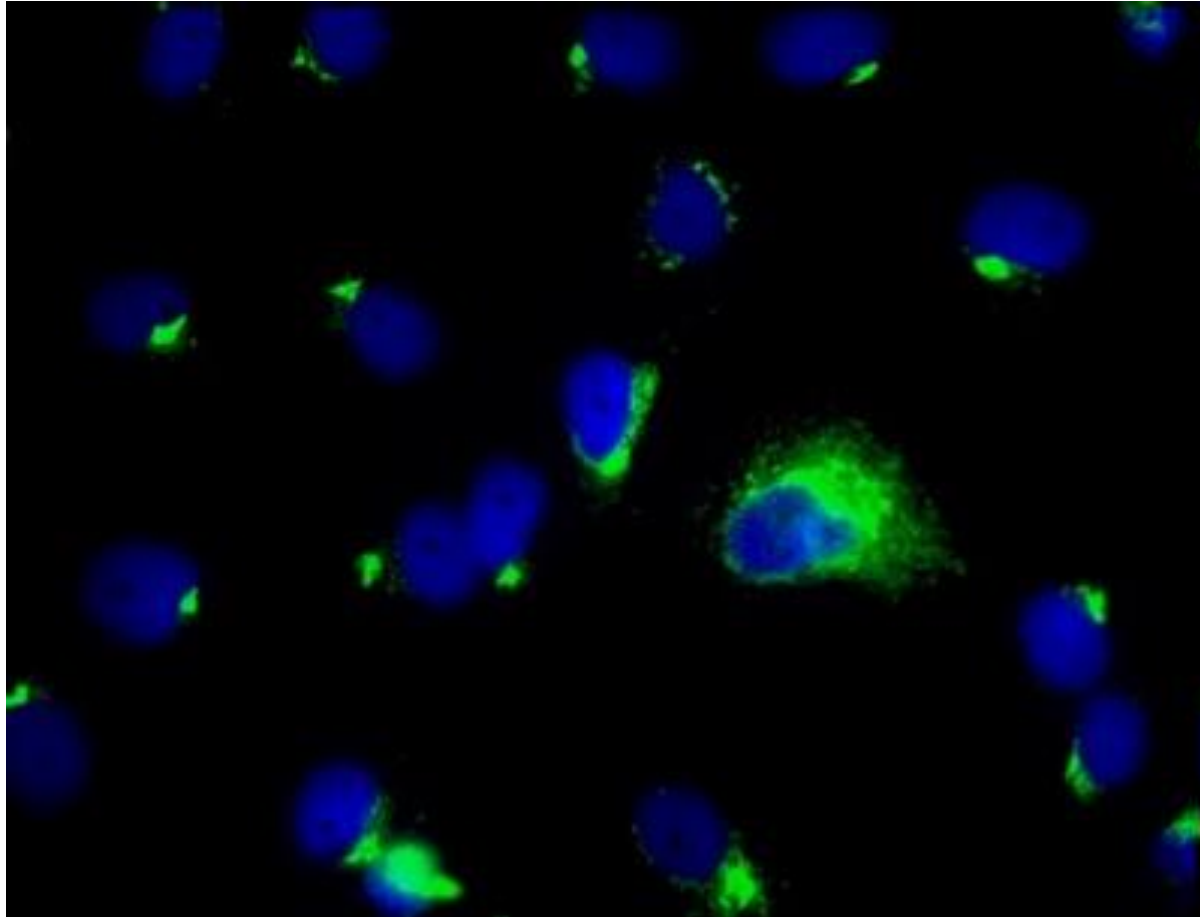
Permite a detecção rápida e específica de antígenos virais

Requer equipamento especializado.

Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

Ensaio Imunofluorescência



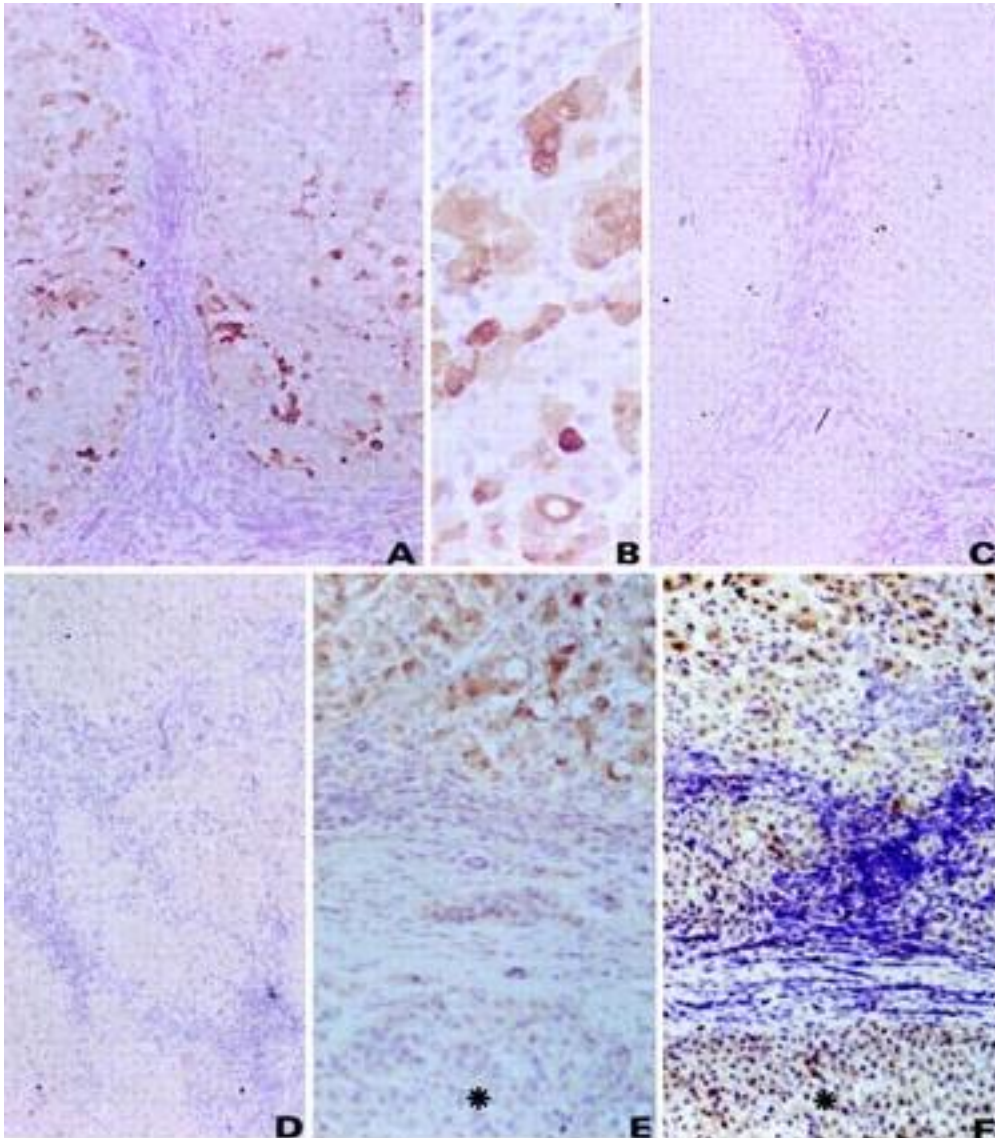
Detecção de vírus da Dengue tipo 2 em células
(glicoproteína E do envelope)

Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

Imunohistoquímica

Detecção de
HCV

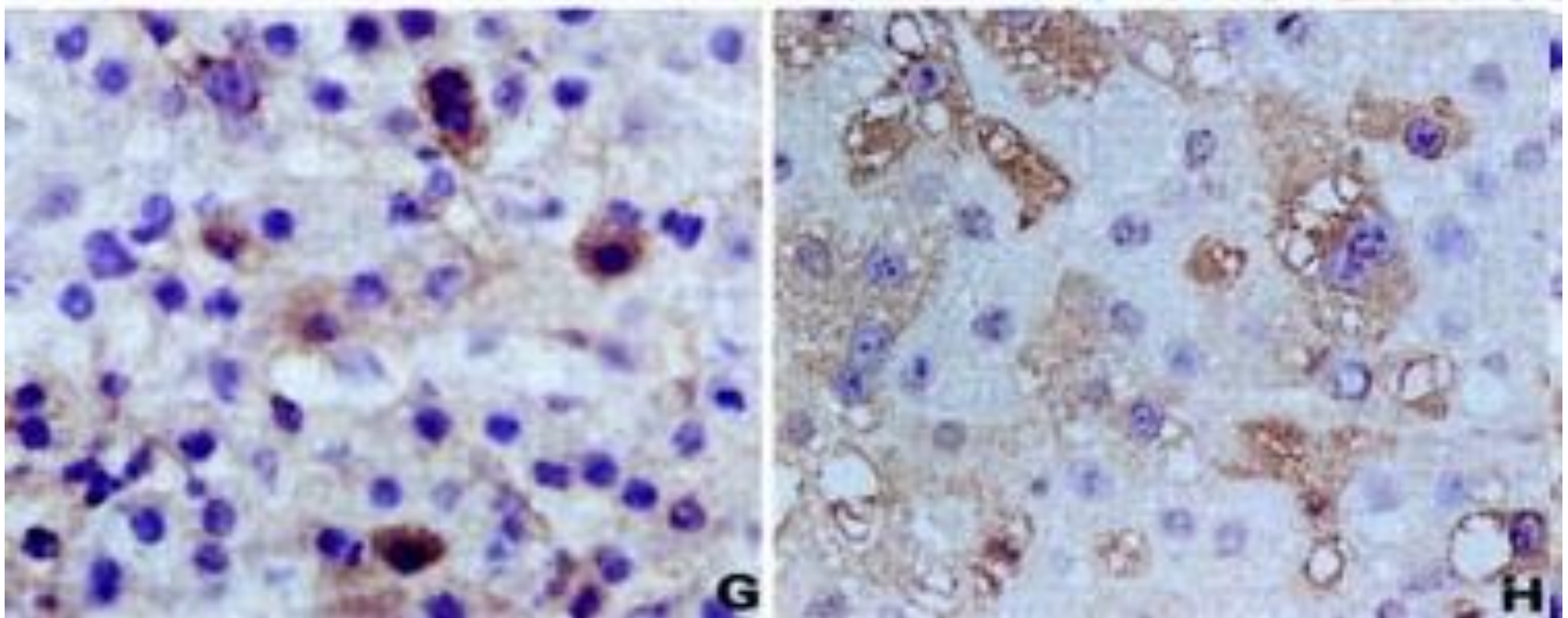


Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

Imunohistoquímica

Detecção de HCV



Estudo de Vírus

Cultivo: Representa o “gold standard”

Sorologia:

Permite a detecção de anticorpos circulantes contra um antígeno viral (exposição e estado imune).

Análise de ácidos nucleicos:

PCR, RT-PCR, PCR em tempo real
Muito sensíveis.

Respiratory Virus Diagnostics

Commercial Molecular Assays for Respiratory Pathogens

Luminex x-TAG RVP

<http://www.luminexcorp.com/rvp/overview.html>

Bead-based assays

Qiagen ResPLEX II

<http://www1.qiagen.com/Products/ResPlexIPanel.asp>

Bead-based assays

EraGen MultiCode PLx RVP

<http://www.eragen.com/contentPage.cfm?ID=430>

Bead-based assays

Seegene Seeplex RPA

http://www.seegene.com/en/diagnosis/d_seeplex.php

Capillary sequencer sizing

MassTag PCR

<http://www.chem.agilent.com/Library/posters/Public/ASMS2007%20Poster%20MPT326.pdf>

Mass spectrometric detection

AutoGenomics INFINITI RVP+

http://www.autogenomics.com/1/infectious_respiratory.php

Biofilm microarray

Idaho Technology FilmArray

[http:// www.idahotech.com/filmarray](http://www.idahotech.com/filmarray)

Multiplex real-time PCR array

CLART *PneumoVir*

[http://www.biomerieux .com.br/](http://www.biomerieux.com.br/)

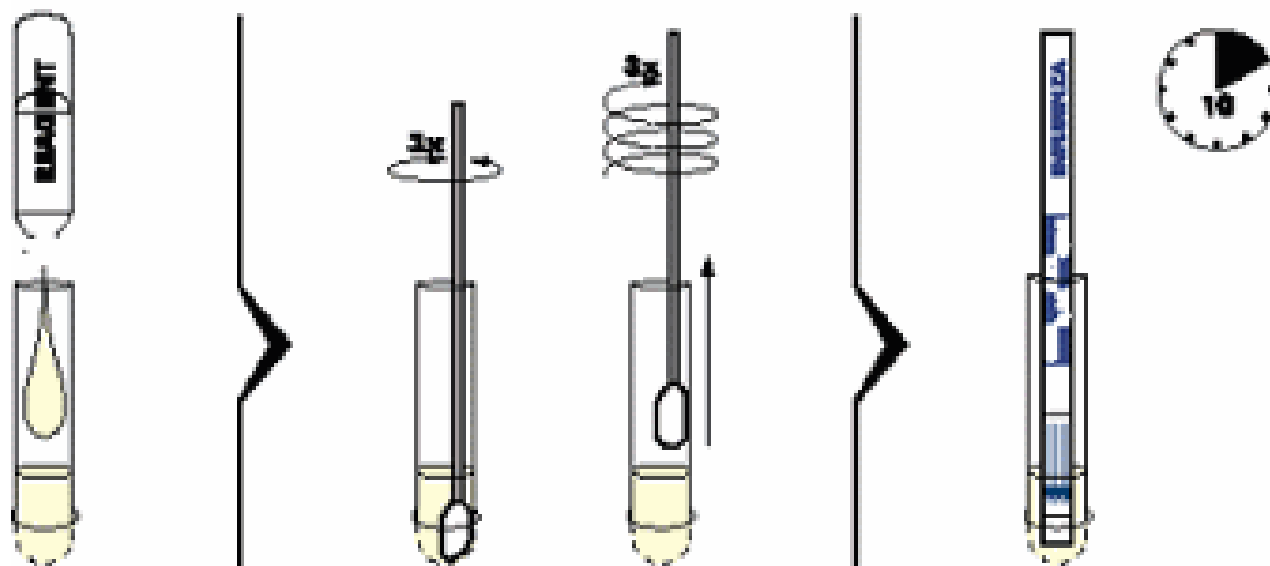
Clinical Array Technology

Fast-Track FTD RP

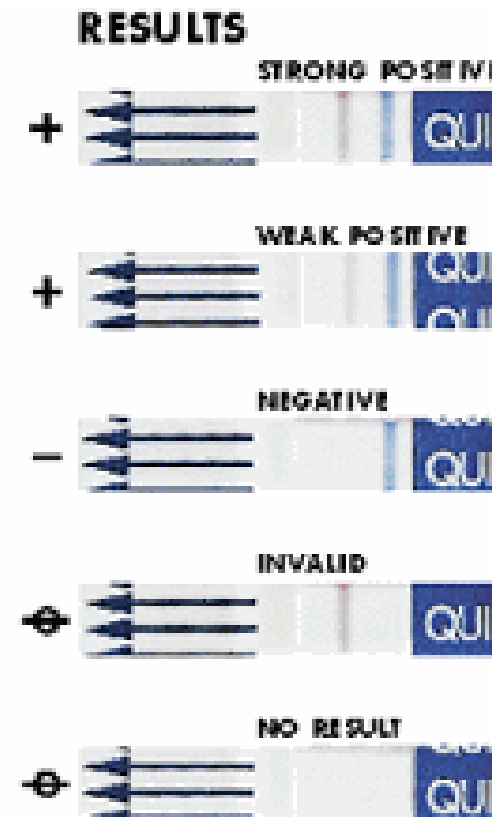
http://www.fast-trackdiagnostics.com/pages/order_cat/catalogue.cgi?state=11&cust=0&cat_no=FTD-2

Multiplex real-time PCR

Kits comerciais para Diagnóstico



anticorpo é detectado por uma reação que gera cor.



Resultado em: **15 minutos**

Obrigado!!!