

BMM 0160 – Microbiologia Básica para Farmácia

Métodos de diagnósticos Virais

Profa. Patricia C. B. Beltrão Braga

Depto de Microbiologia- ICB/USP



Estudo de Vírus

Métodos:

Diretos

Microscopia
Eletrônica

Indiretos

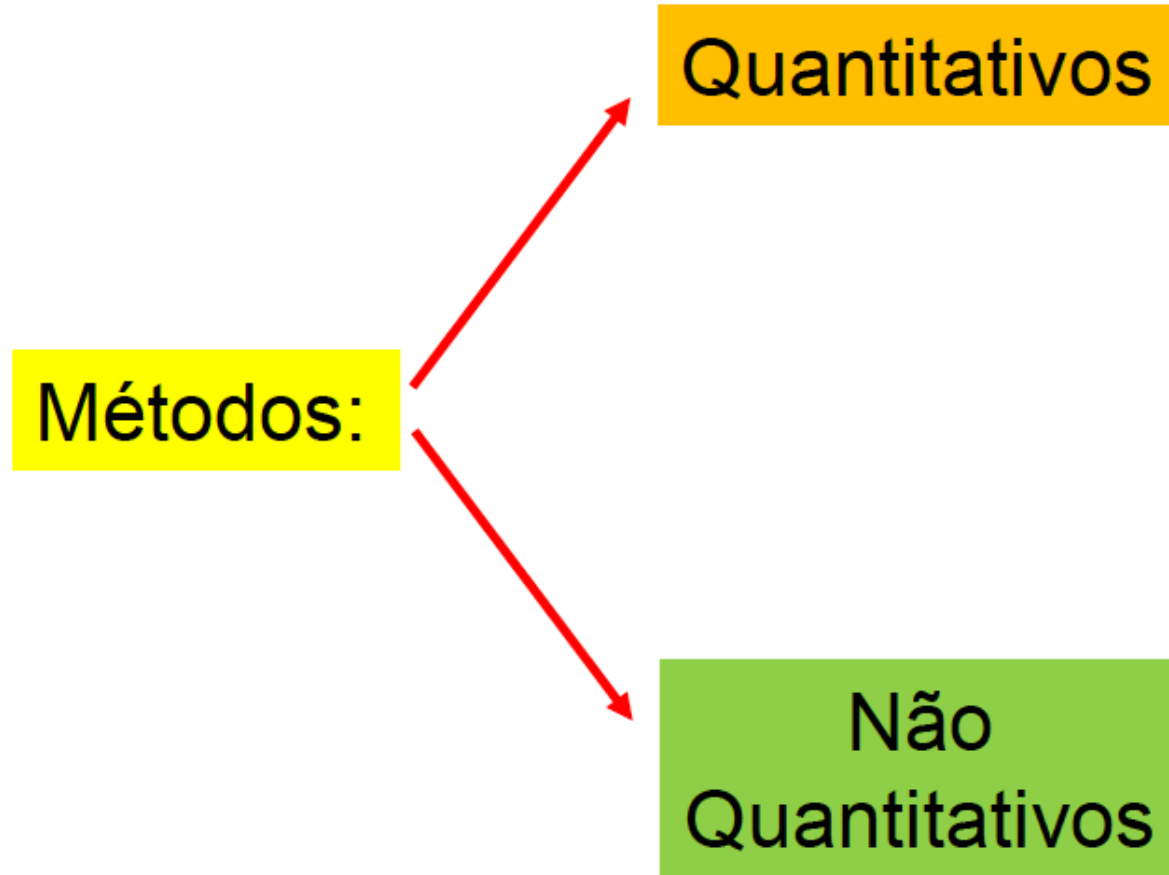
Cultivo
Análise de Proteínas
Análise de Ácidos nucleicos
Métodos sorológicos

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

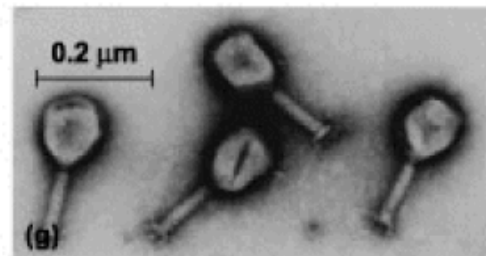
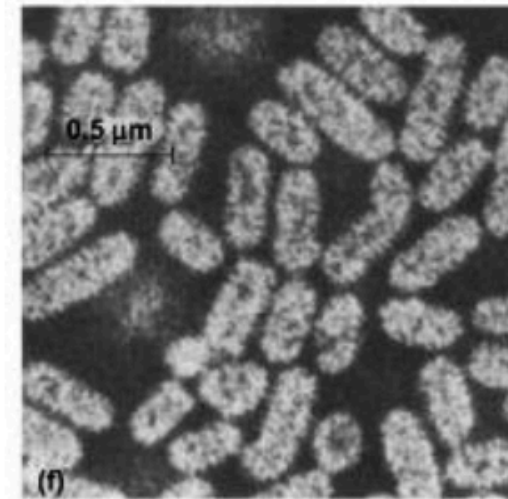
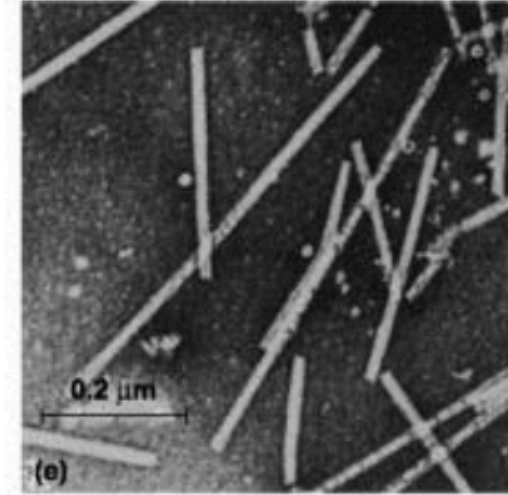
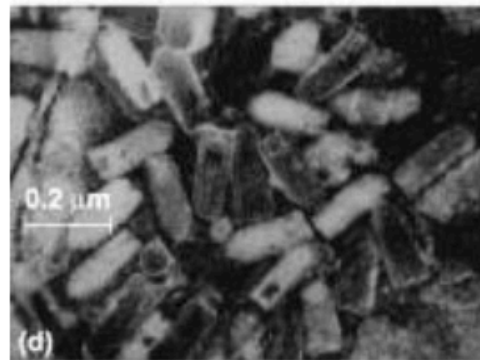
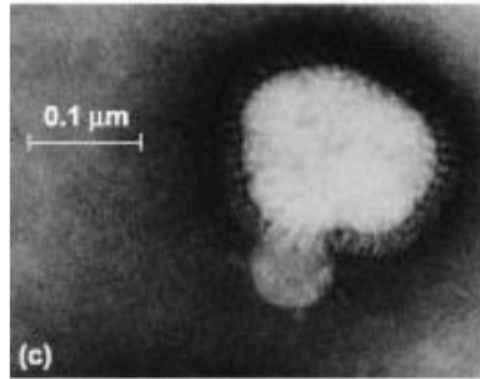
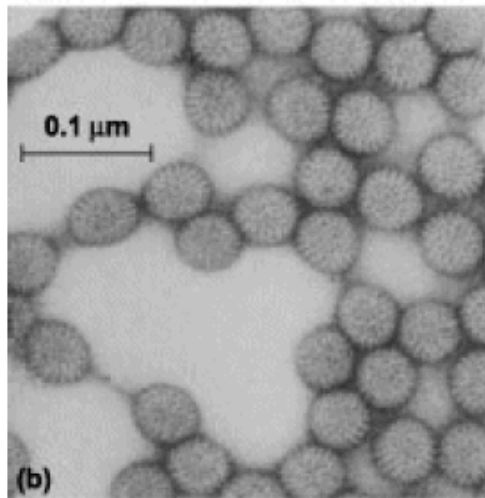
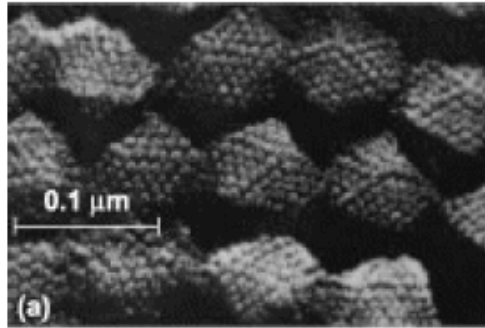
Estudo de Vírus

Diagnóstico laboratorial das viroses

- ❖ Métodos laboratoriais:
 - ❖ Diagnóstico clássico
 - ❖ Diagnóstico rápido
 - ❖ Diagnóstico molecular

Microscopia Eletrônica

Estudo de Vírus



Direto

Estudo de Vírus

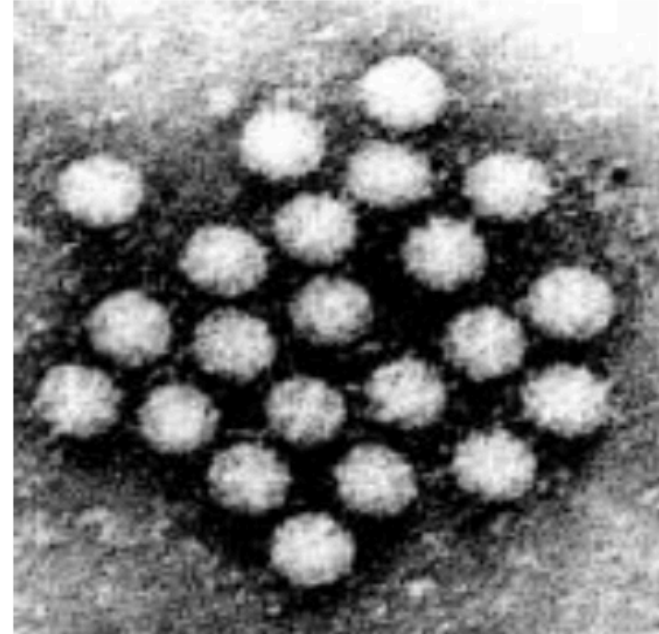
Microscopia eletrônica

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

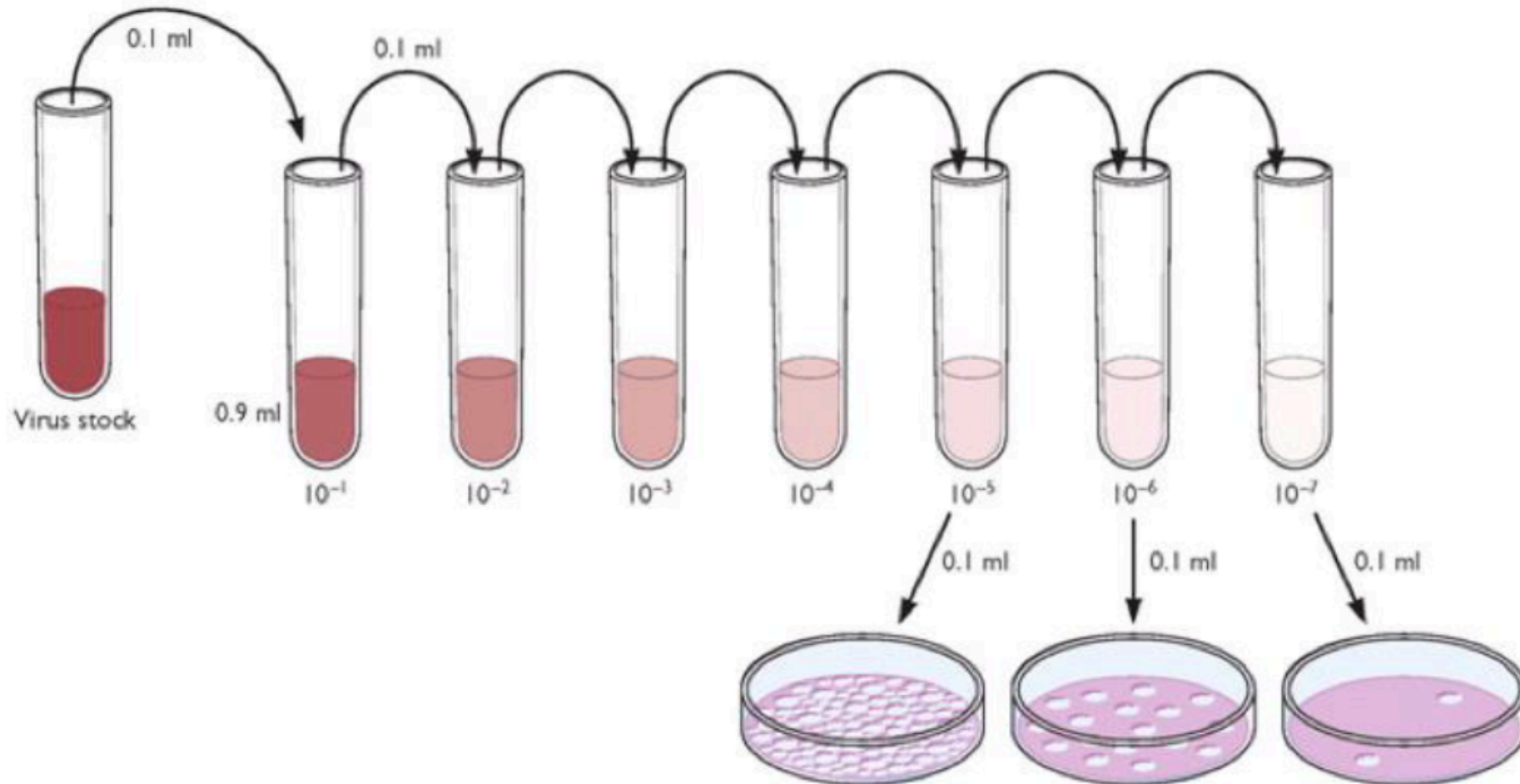
Isolamento

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



Estudo de Vírus

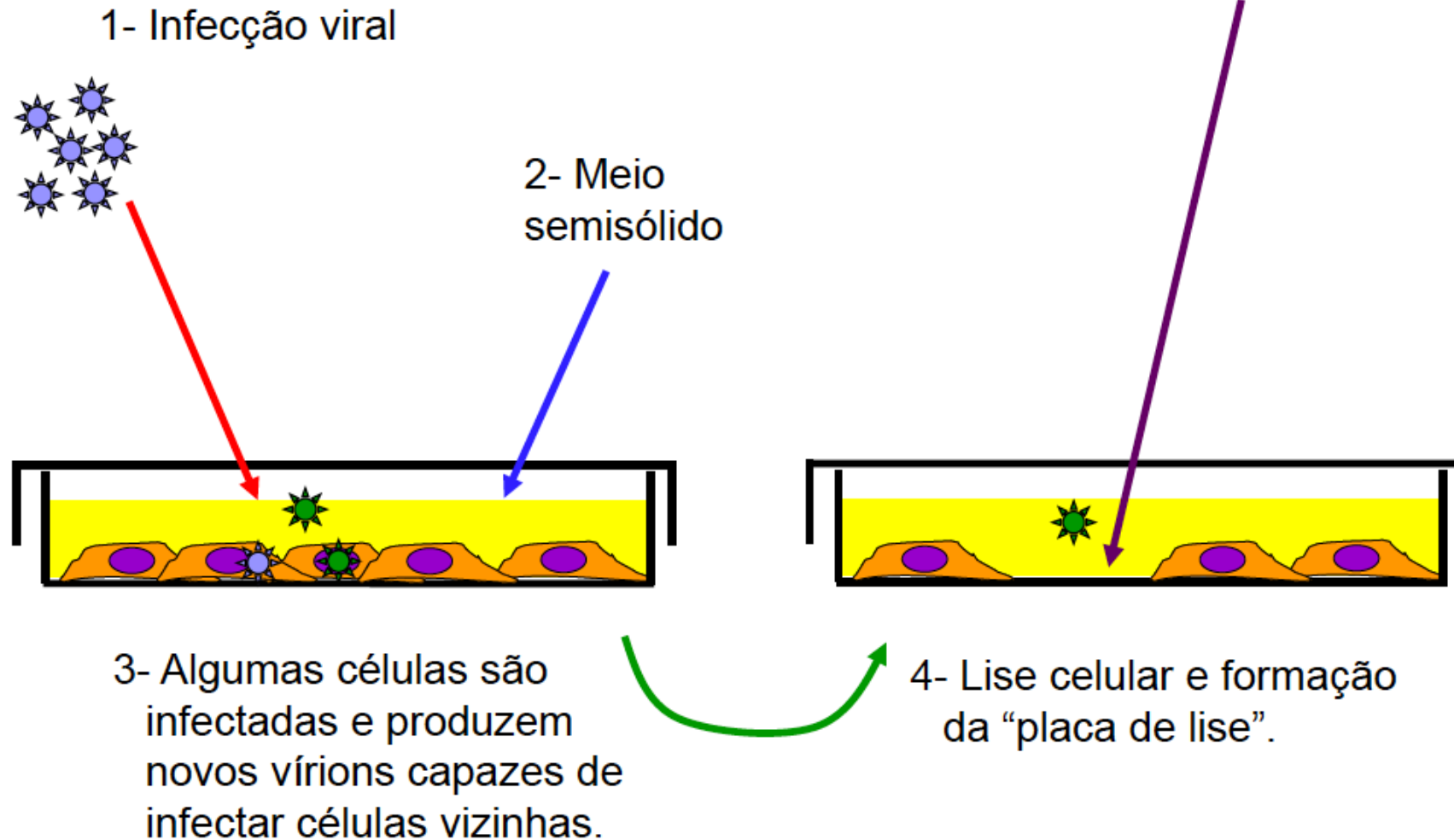
Tudo começa com a diluição seriada da amostra:



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

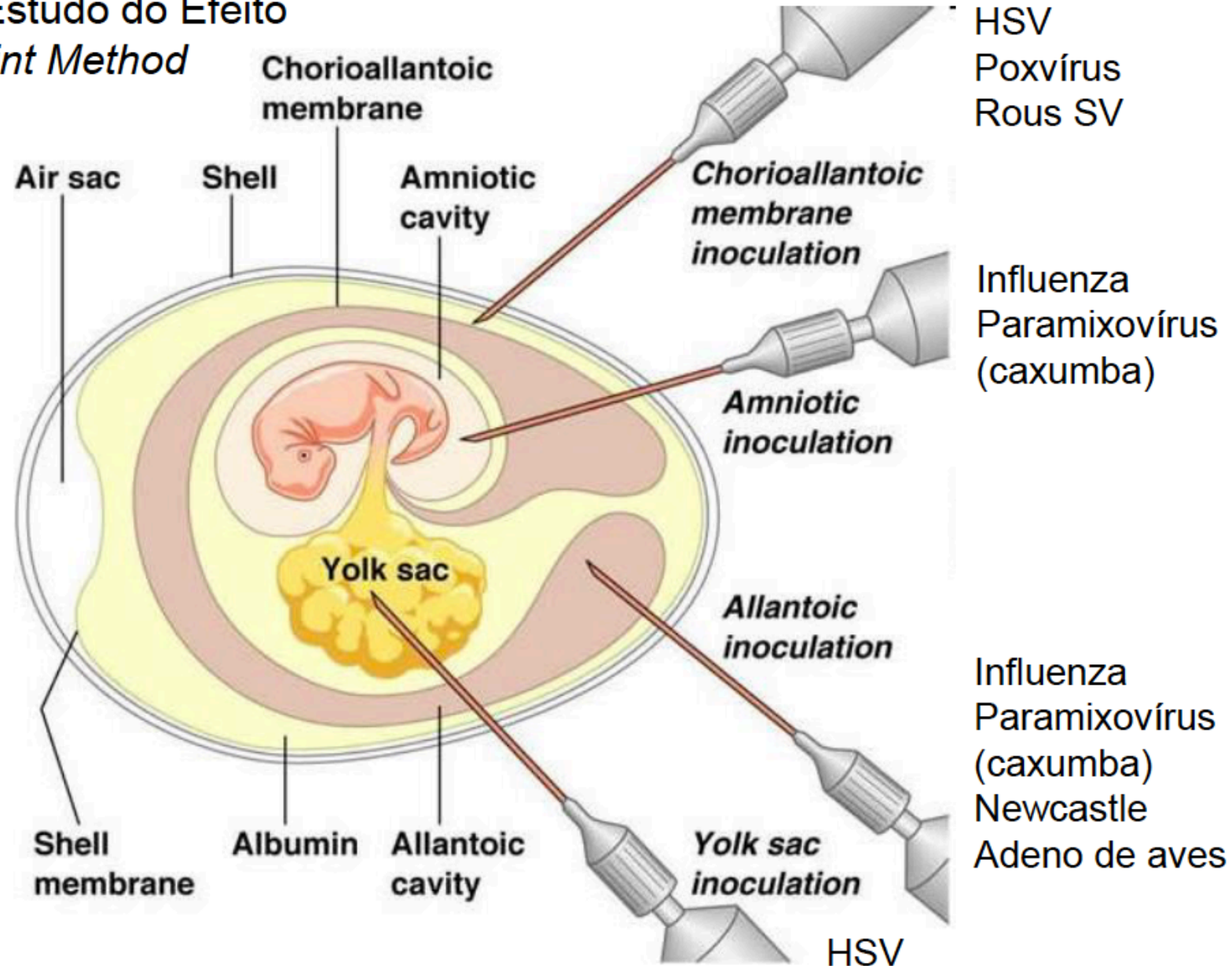
Método de Estudo do Efeito *Endpoint Method*

- 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



Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

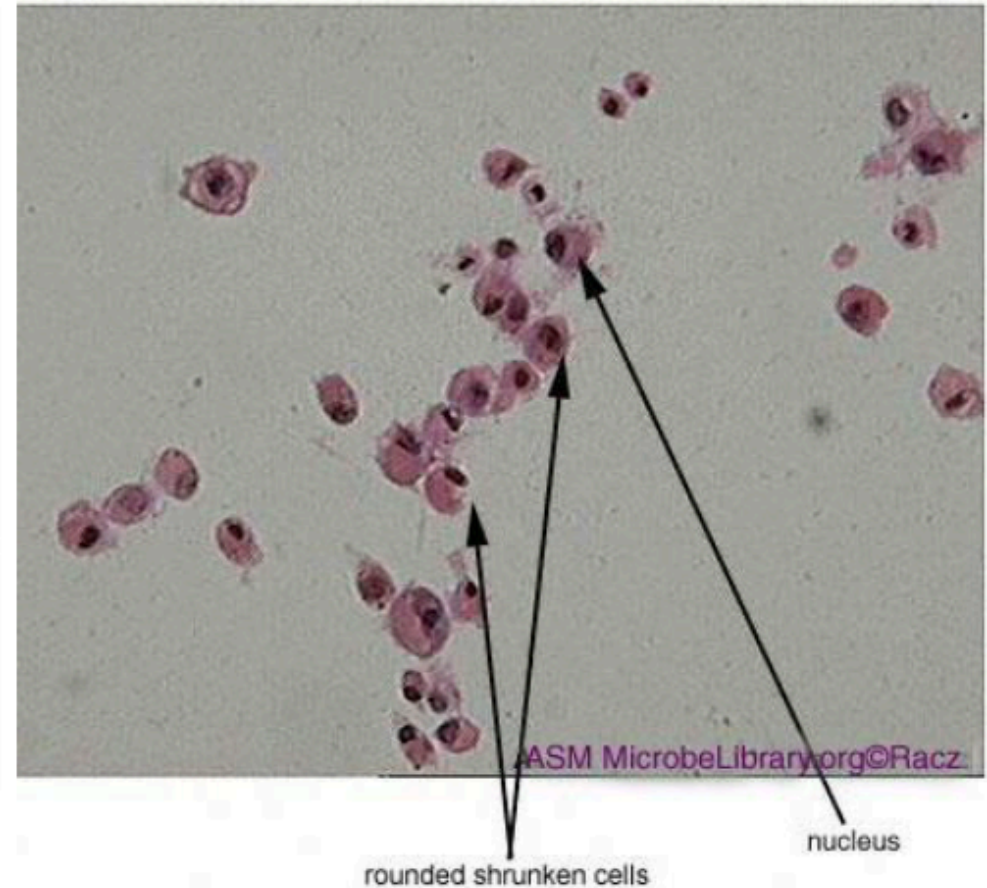
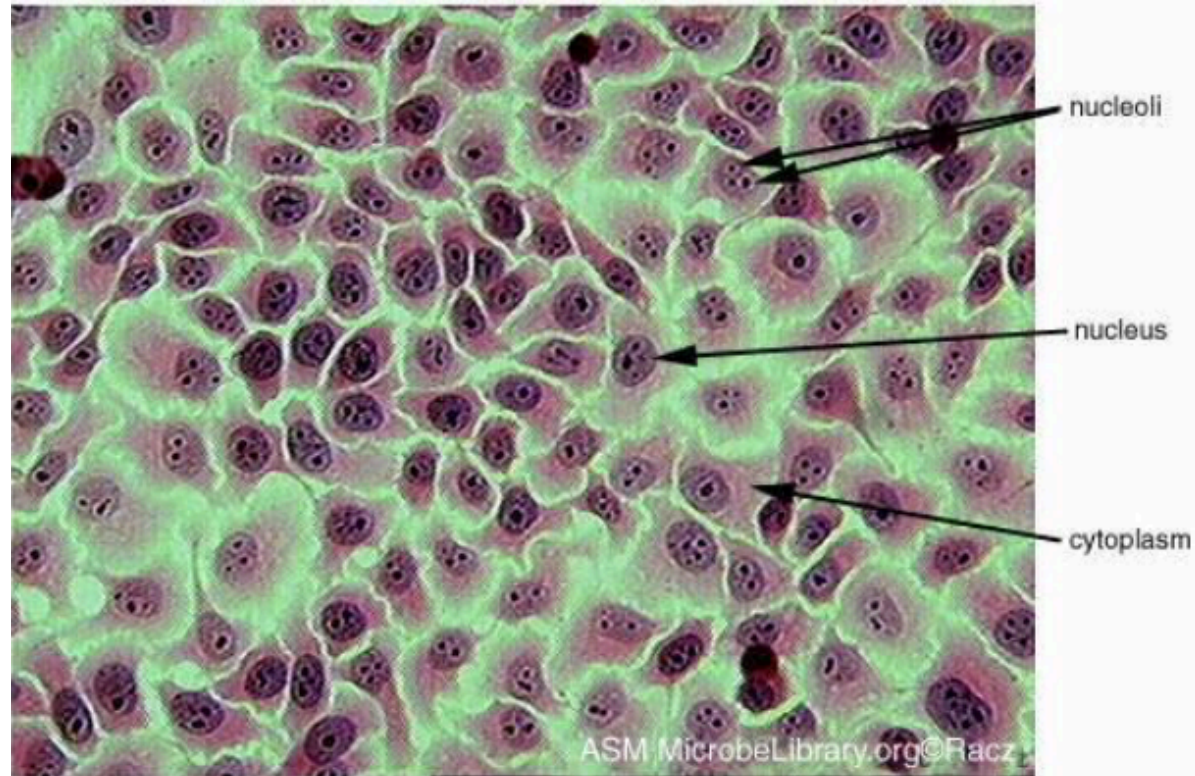
Cultura de células

- 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*

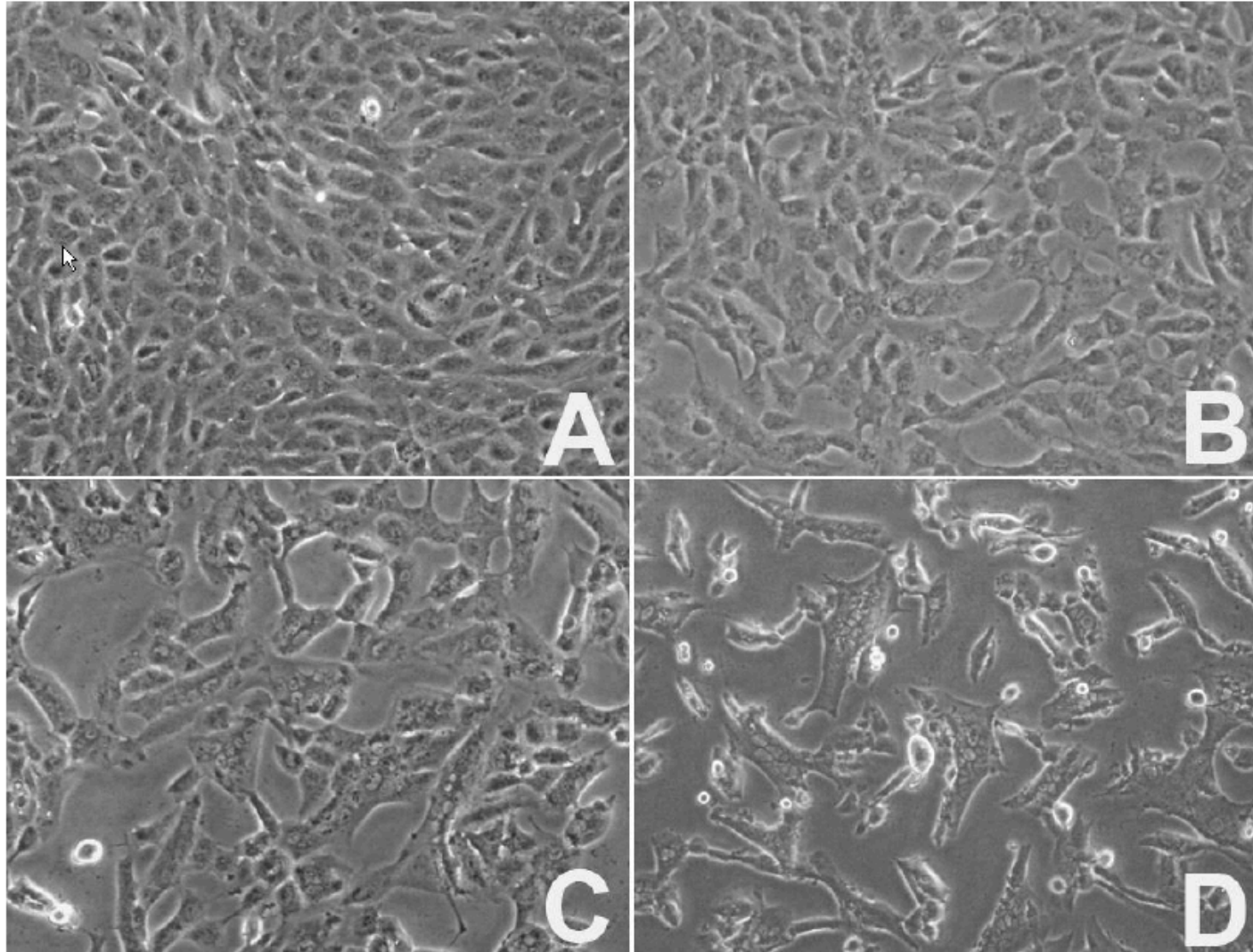
ECP Células Vero antes e após infecção com poliovírus tipo 1



Estudo de Vírus

Método de Estudo do Efeito
Endpoint Method

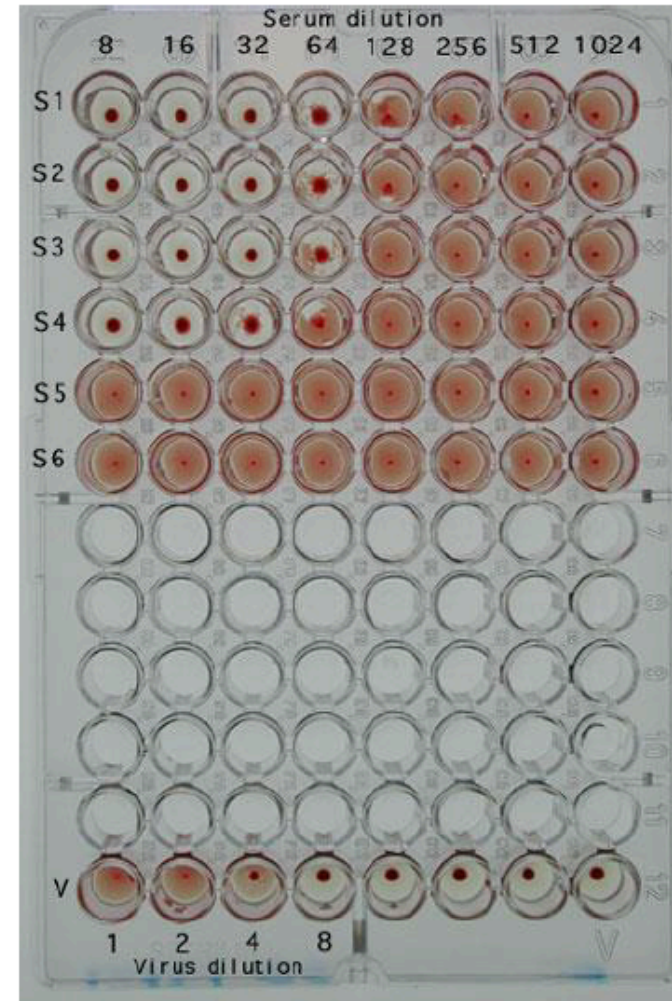
ECP em Células epiteliais antes e após infecção HSV-1 (0-8-12-24hs)



Métodos Baseados em Sorologia

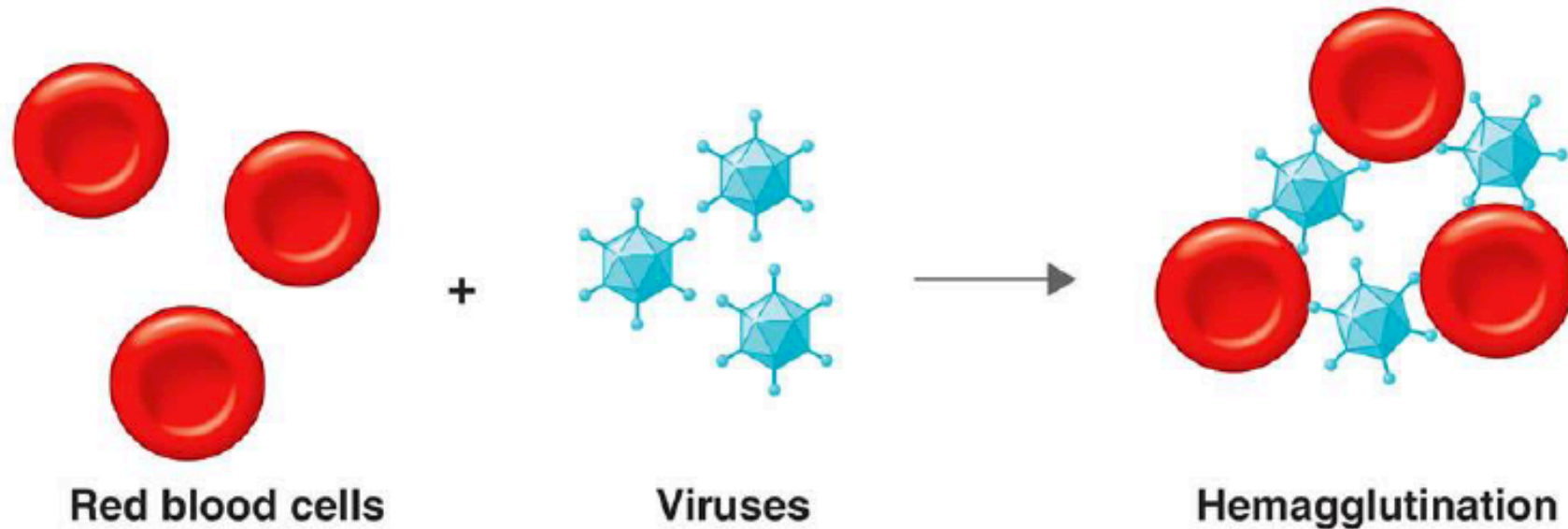
Métodos de diagnóstico rápido

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



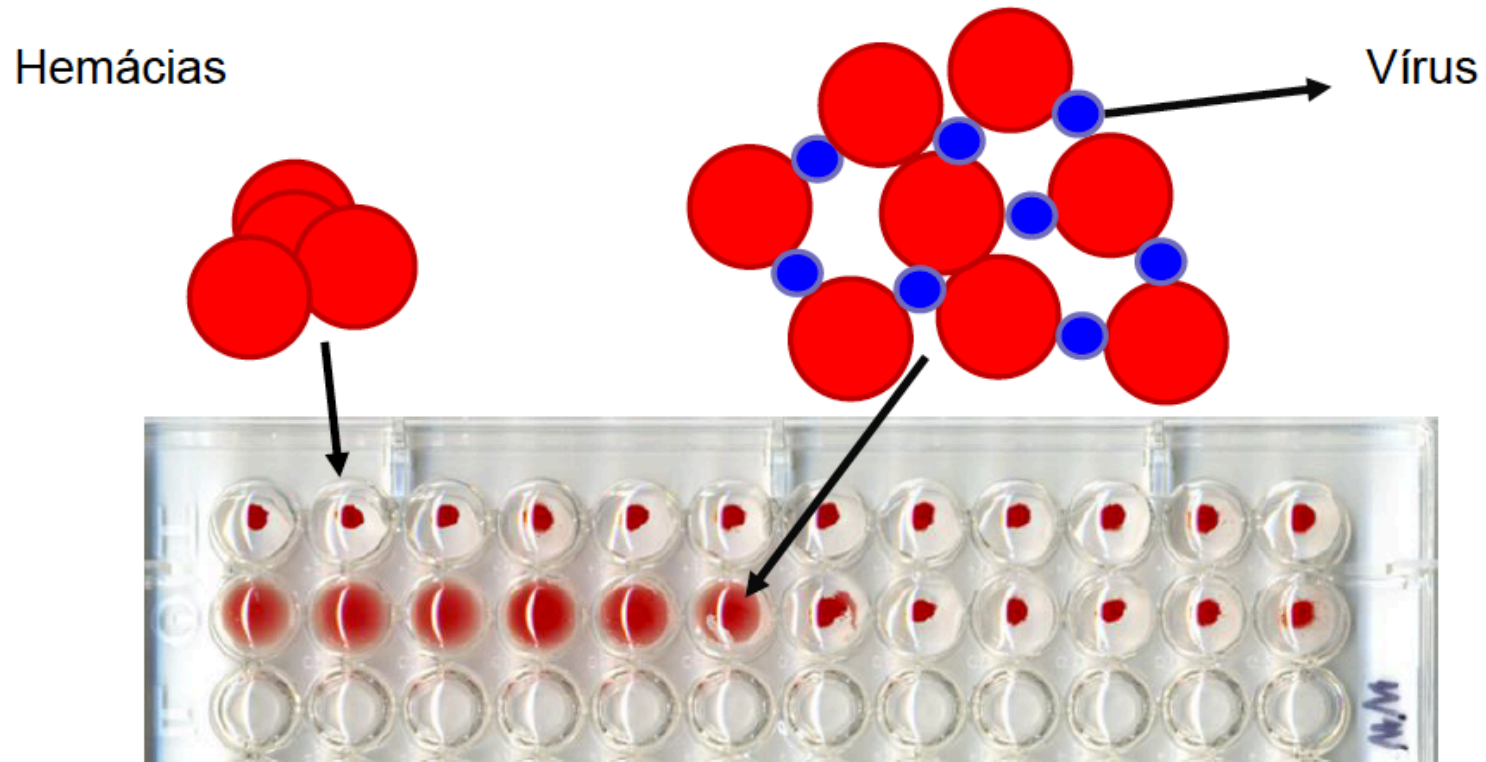
Estudo de Vírus

Ensaio de Hemaglutinação



Estudo de Vírus

Ensaio de Hemaglutinação

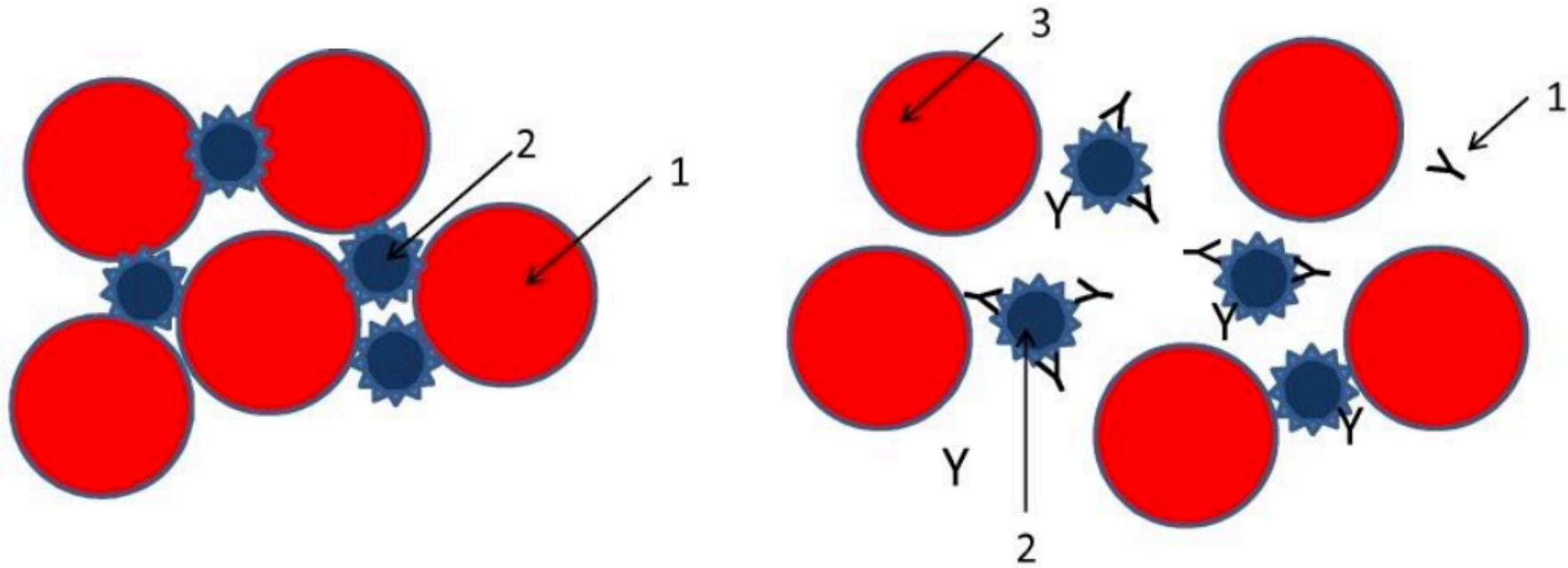


Ensaio rápido e barato. Permite determinar o título viral.

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

Estudo de Vírus

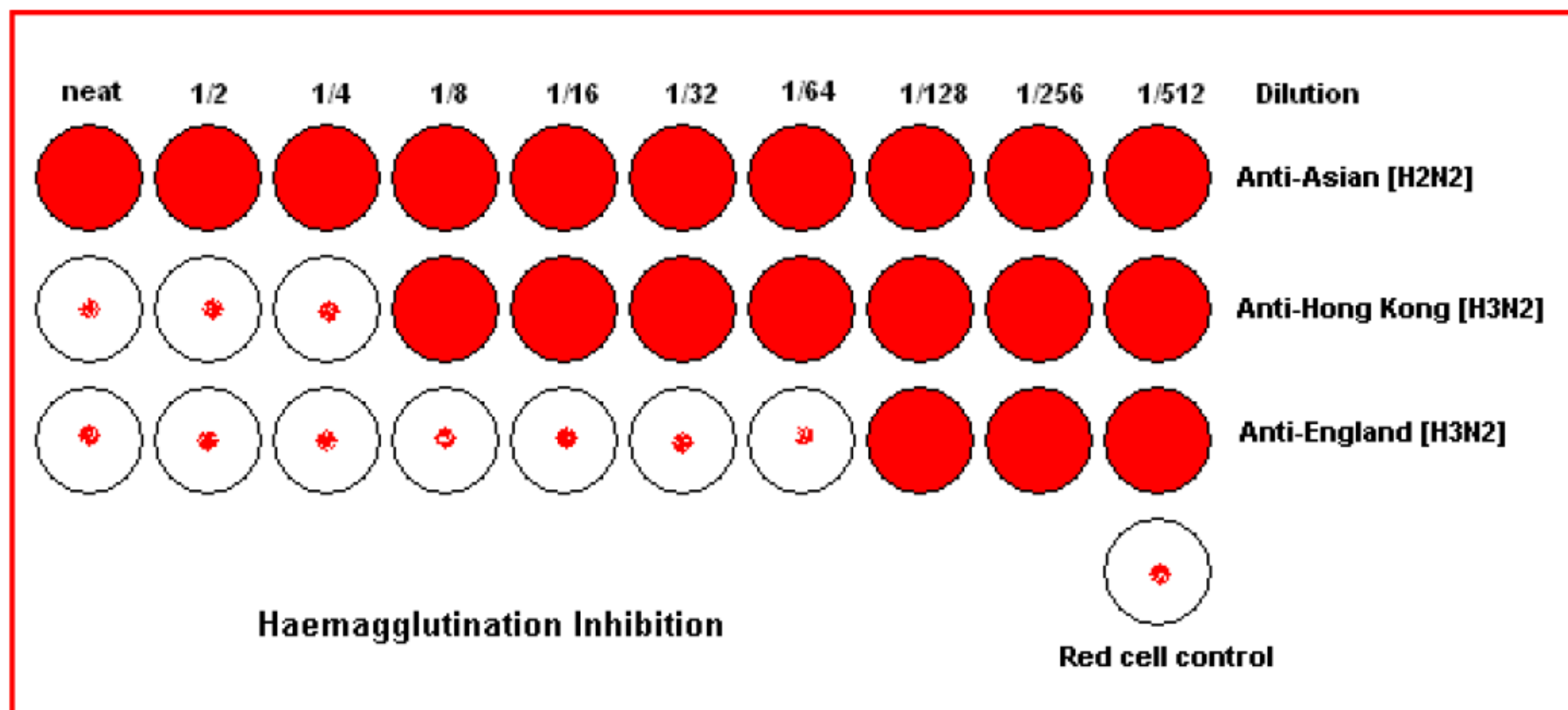
Ensaio de Inibição da Hemaglutinação



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

Estudo de Vírus

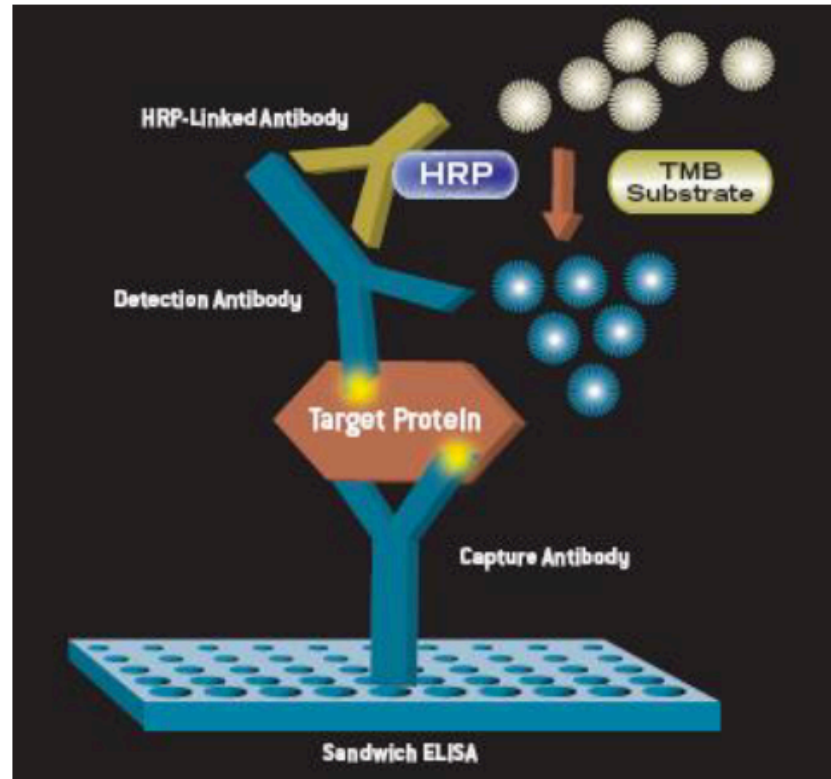
Ensaio de Inibição da Hemaglutinação



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

Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos (RIA, EIA, ELISA)



RIA – radio imuno ensaio

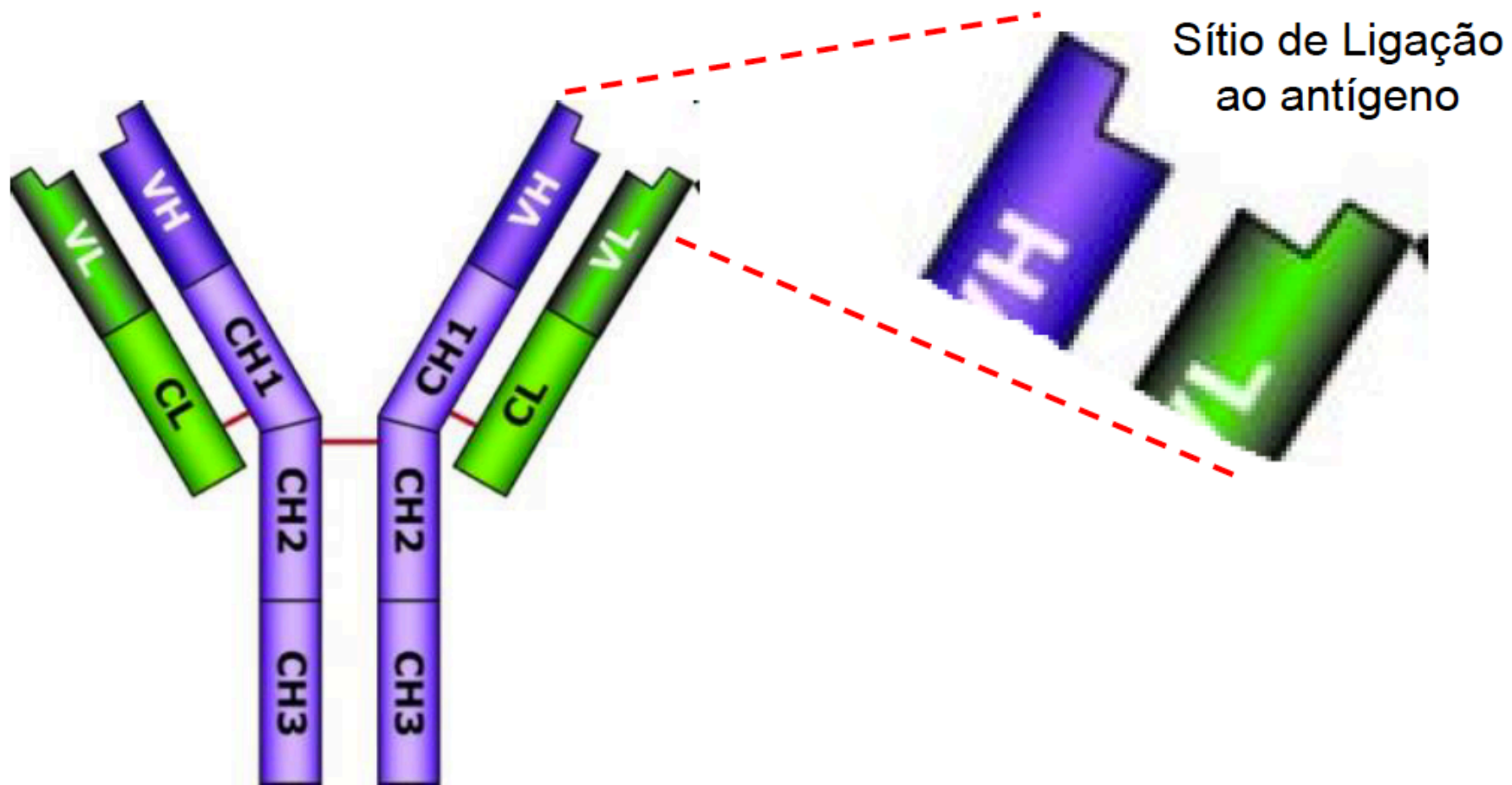
EIA – enzima imuno ensaio

ELISA – enzyme-linked immunosorbed assay

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

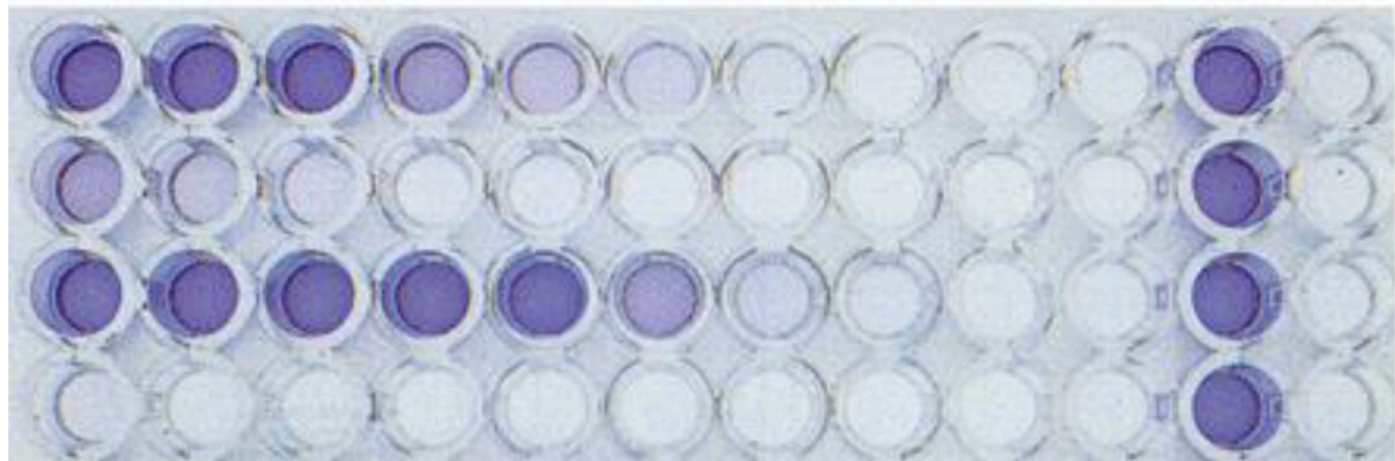
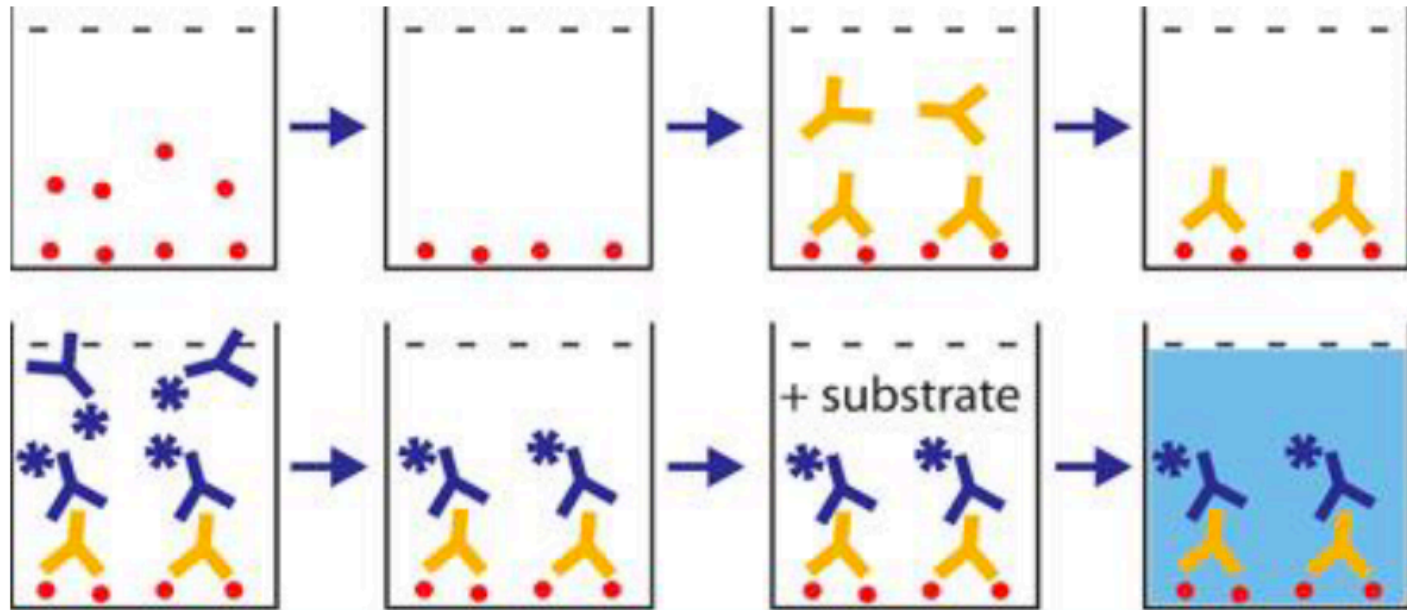
Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos



Estudo de Vírus

Ensaio baseado em anticorpos (RIA, EIA, ELISA)



Métodos Moleculares

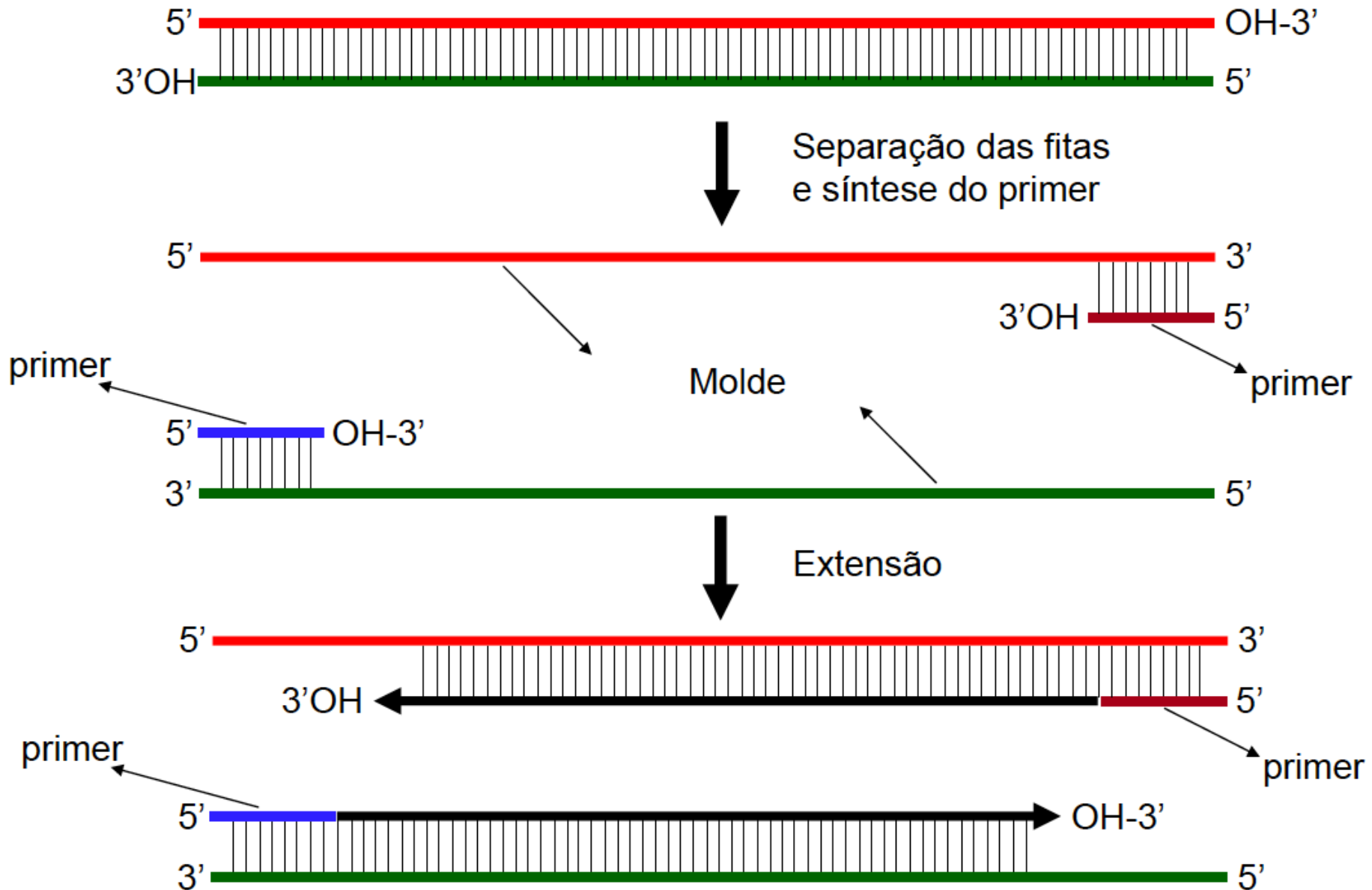
Estudo de Vírus

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

- Análise de Ácidos nucleicos.
- Análise de Proteínas.

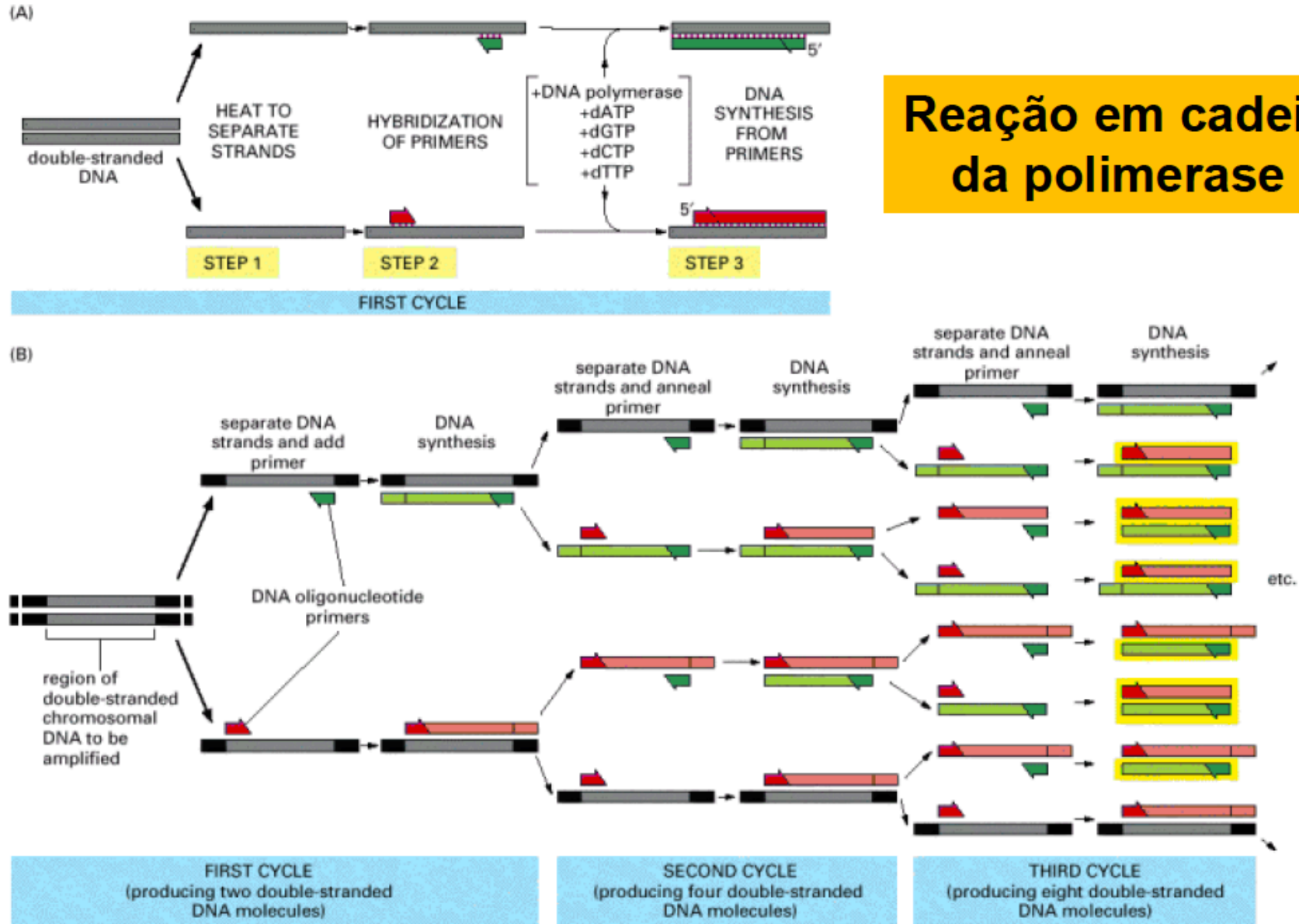
Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos



Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos



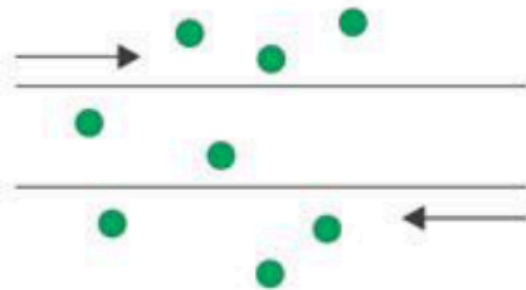
Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos

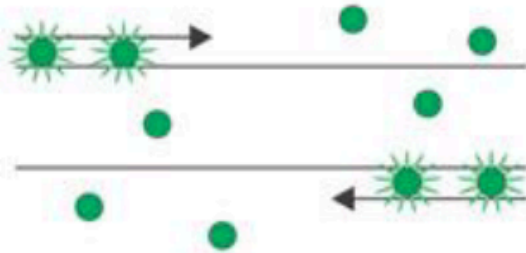
PCR em tempo real

a SYBR Green I

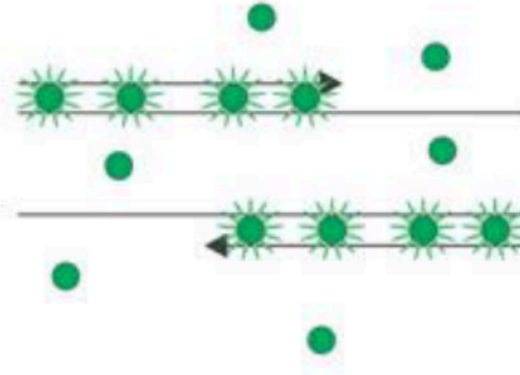
Annealing phase



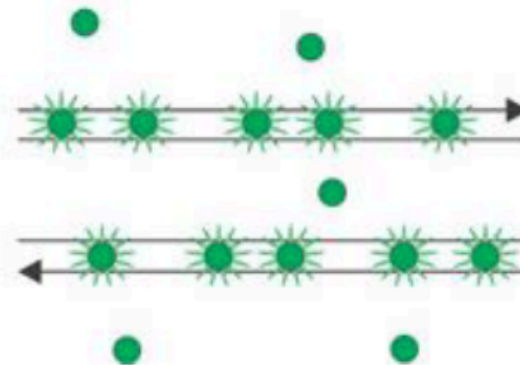
Extension phase (I)



Extension phase (II)



End of PCR cycle



Estudo de Vírus

Amplificação de ácidos nucleicos

PCR em tempo real

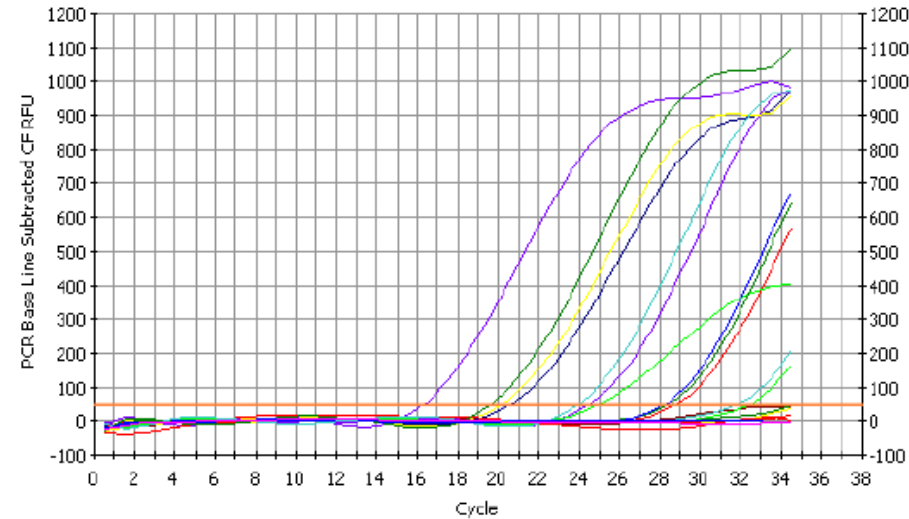
Amplificação e quantificação de sequências gênicas específicas

Vantagens

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

Desvantagens

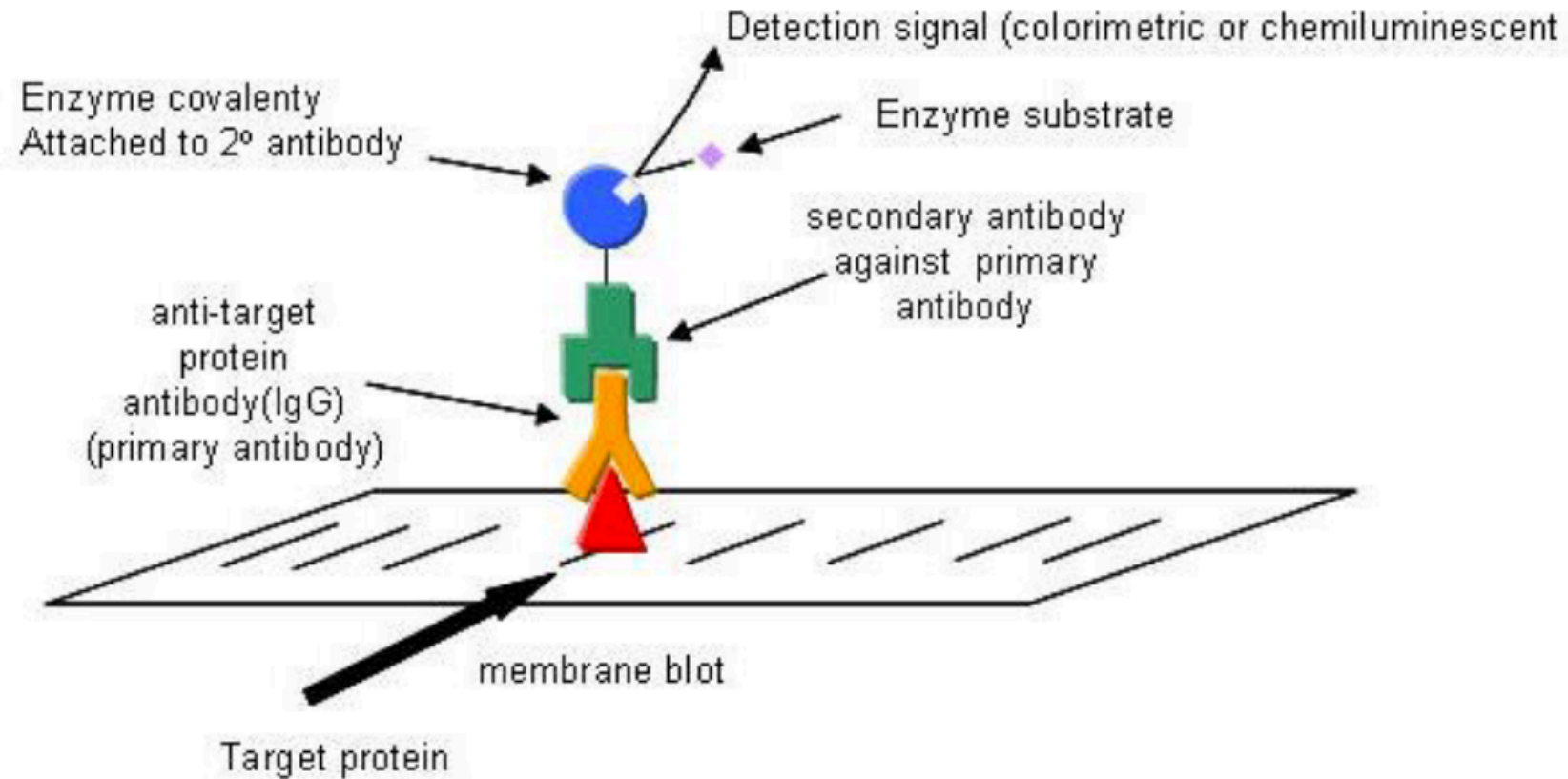
- nem sempre disponível – caro
- Padronização delicada



Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

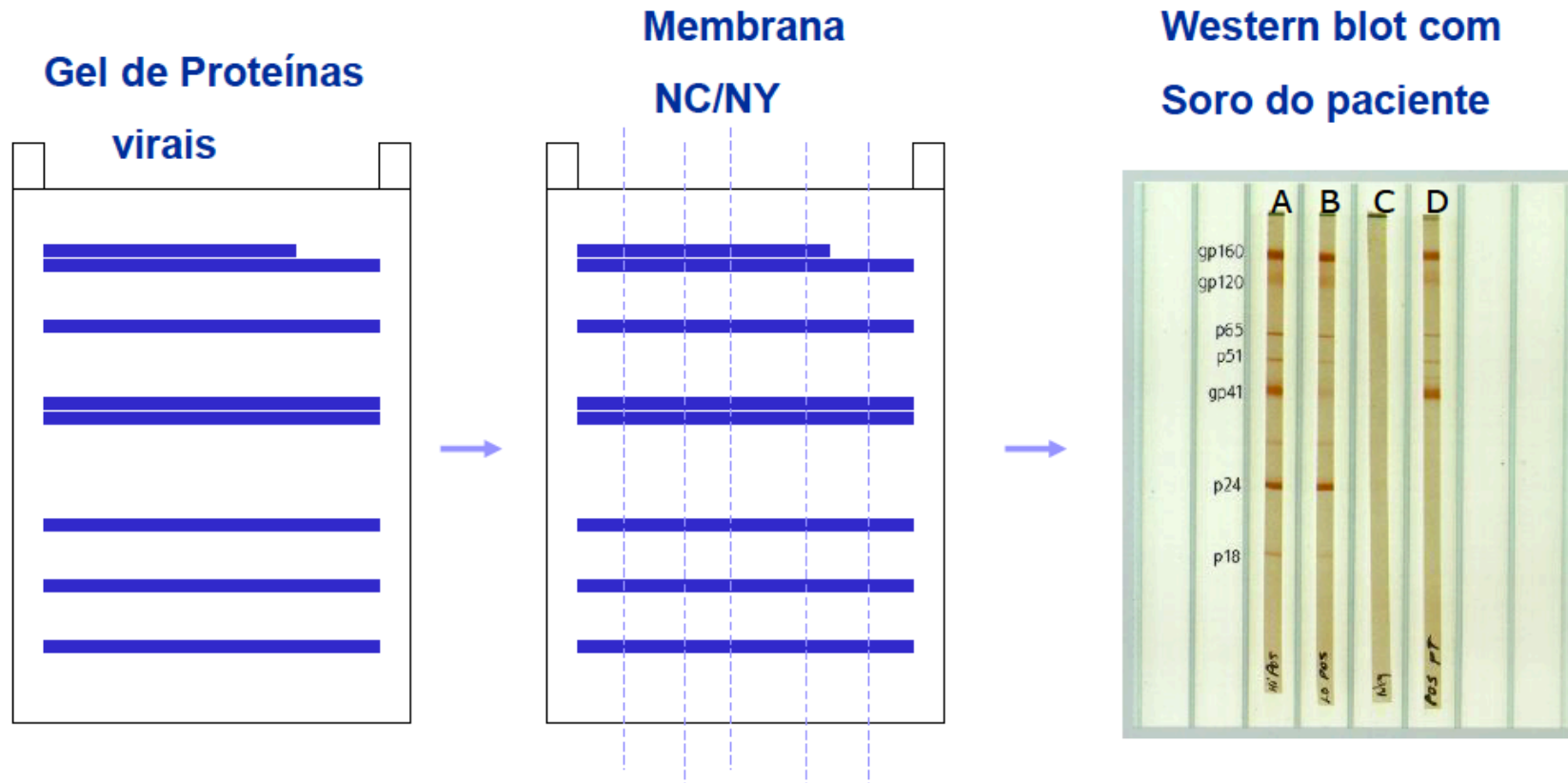
Western blot



Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

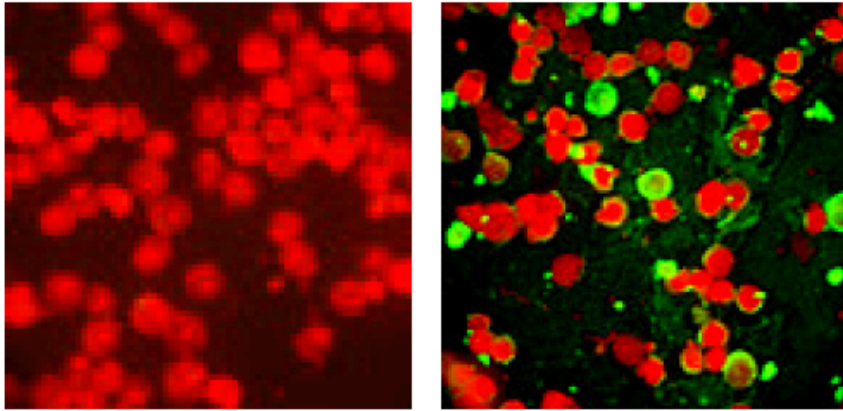
Western blot



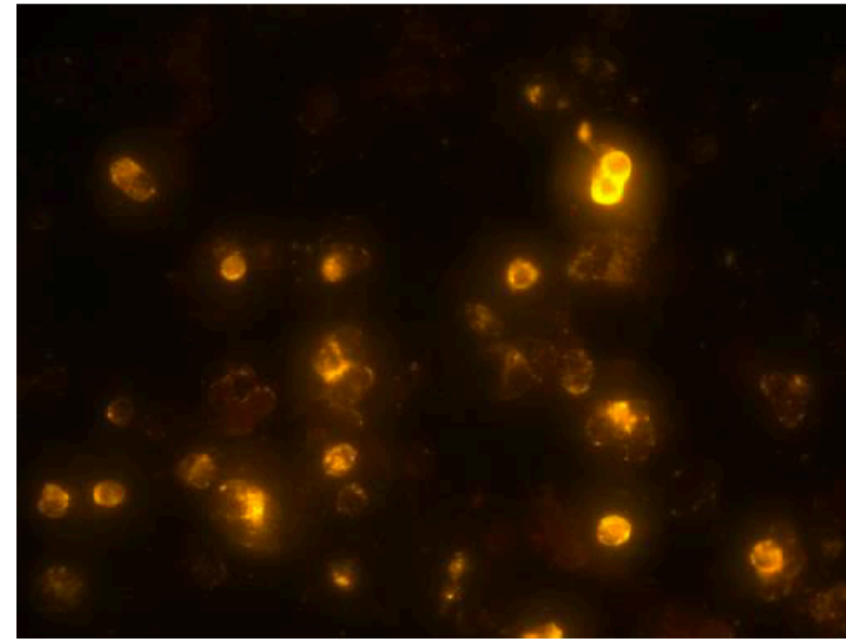
Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas

Ensaio Imunofluorescência



VRS



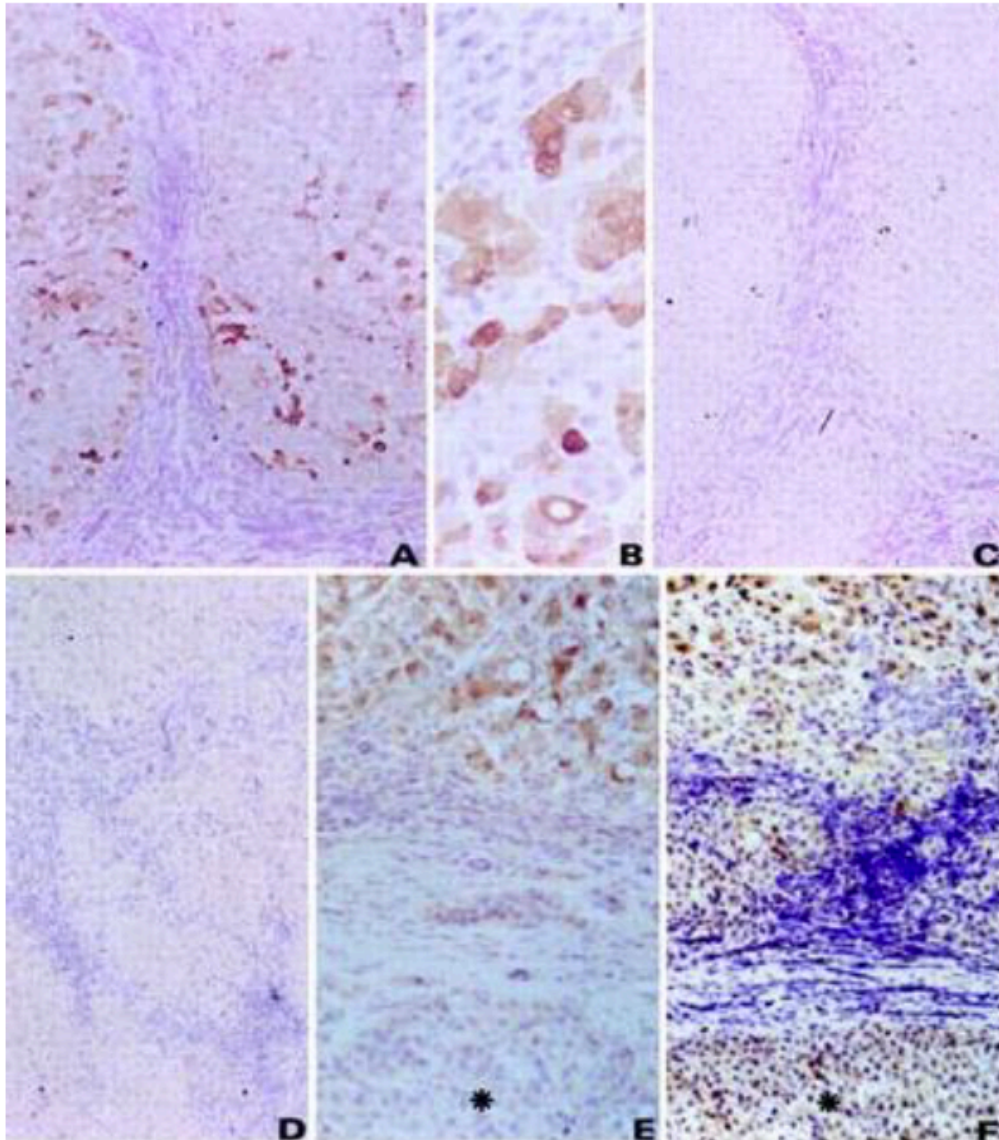
Influenza A

Permite a detecção rápida e específica de antígenos virais

Requer equipamento especializado.

Estudo de Vírus

Detecção de Proteínas



Imunohistoquímica

Detecção de
HCV

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/>

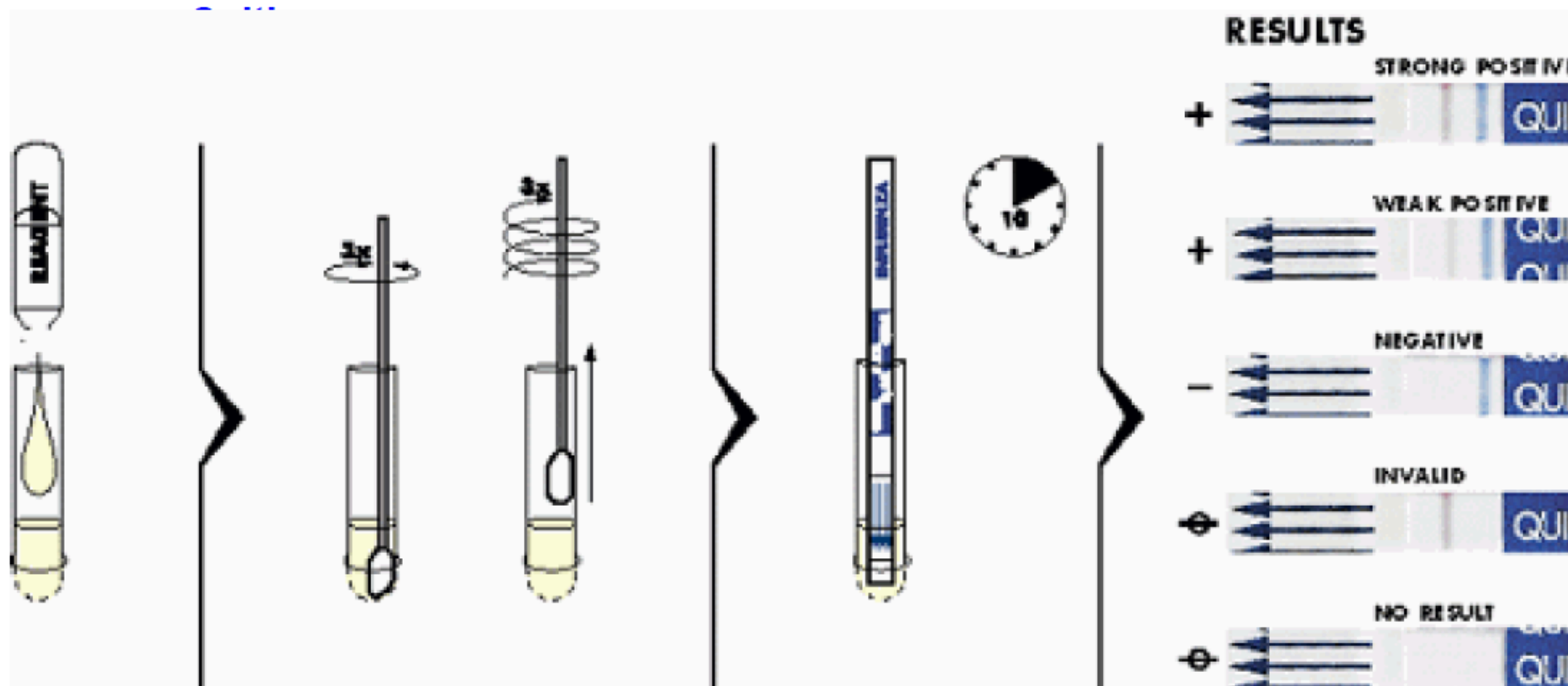
Clinical Array Technology

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 e detectado por uma reação que gera cor.

Resultado em: **15 minutos**