



MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM DOENÇAS DAS AVES

Diagnóstico laboratorial

Profa Dra Helena Lage Ferreira

Disciplina: ZMV-1360 (Epidemiologia e Diagnóstico de Doenças Aviárias)

AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO

- Aves vivas ou mortas
- Tecidos
- Lâminas com “impressão” ou “esfregaços”
- Suabes
- Sangue / Soro
- Fezes
- Ração / Água / Ovos

Coleta de material

- Sangue
 - Veia Braquial

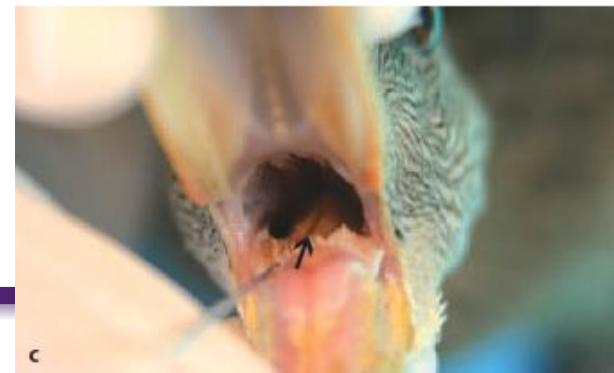
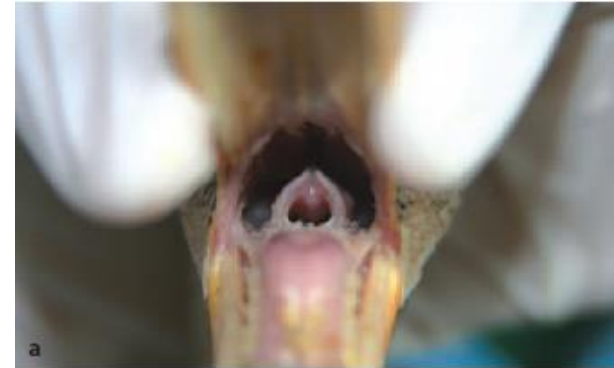


Coleta de material

- Processamento do sangue
 - Plasma
 - Soro



Coleta de material- Suabes



Coleta de material

○ Suabes cloacais



Coleta de material

○ Suabes

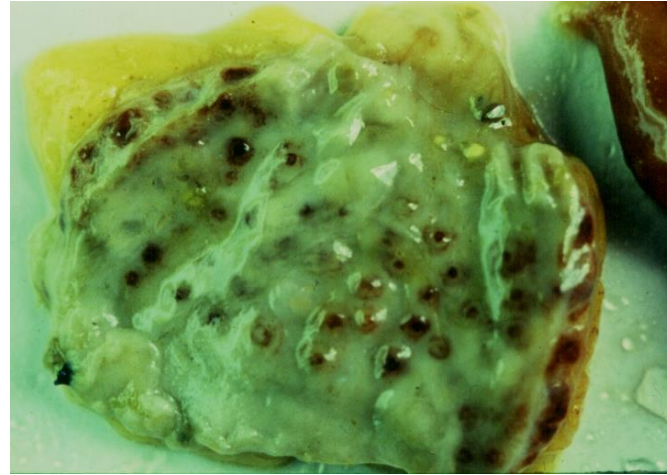


NECROPSIA

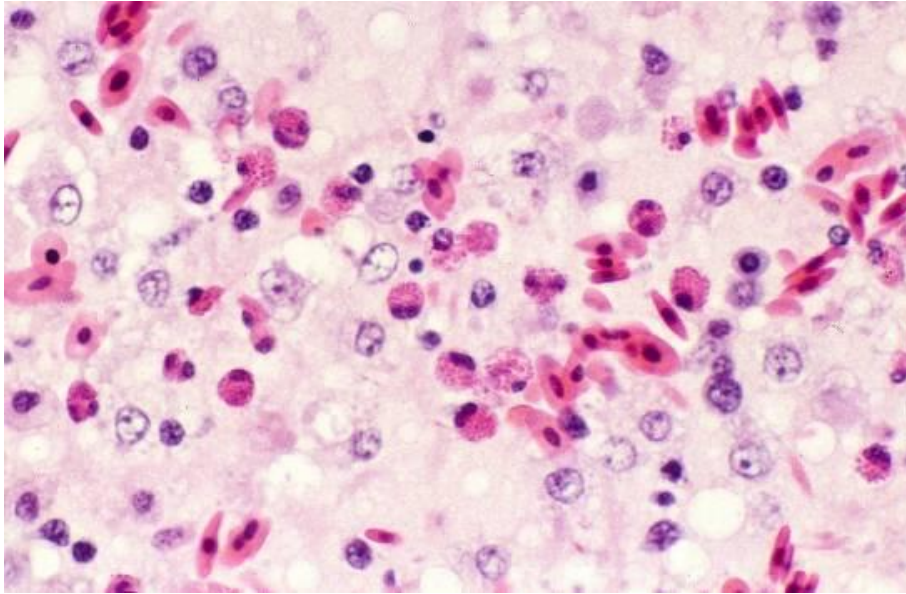


<http://partnersah.vet.cornell.edu/veterinarians/avian-necropsy-examination>

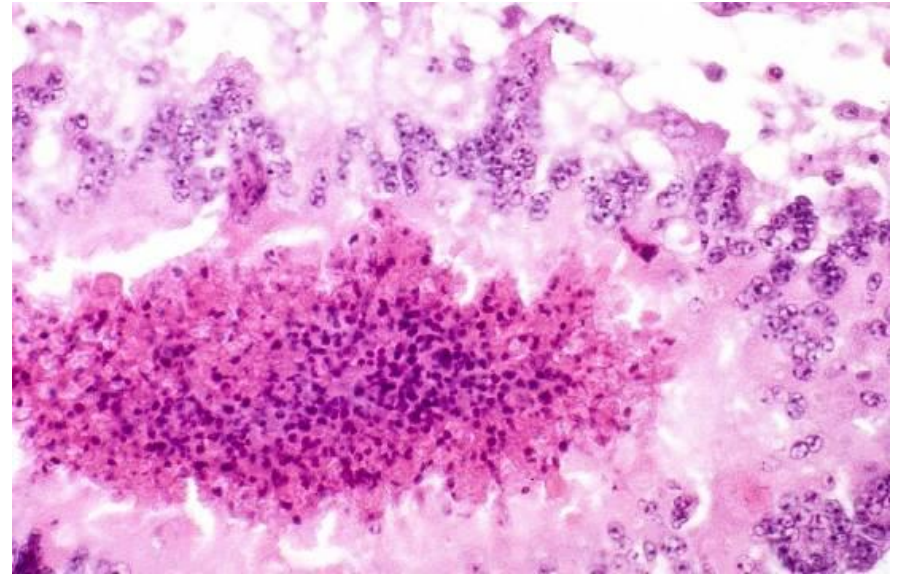
LESÕES MACROSCÓPICAS



HISTOPATOLOGIA

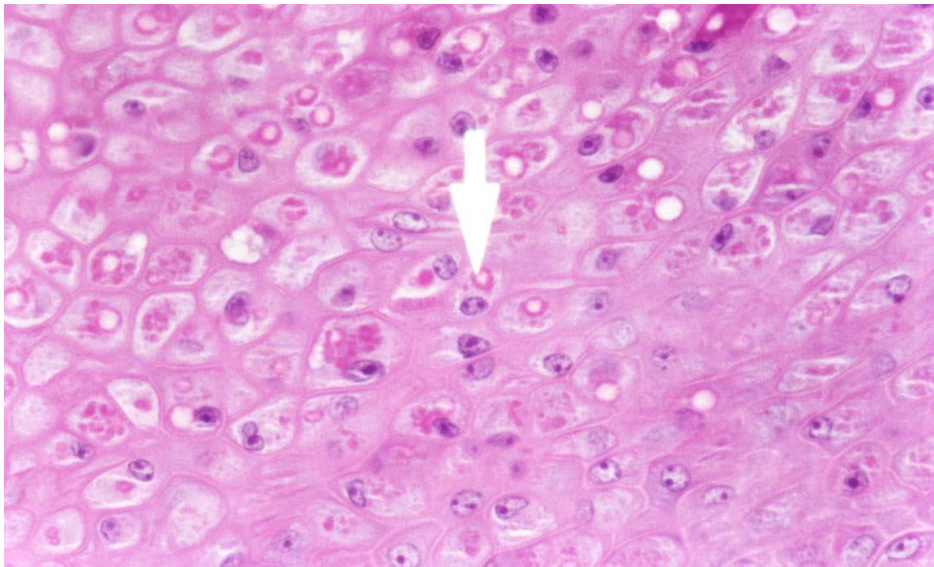


Infiltrado Heterofílico

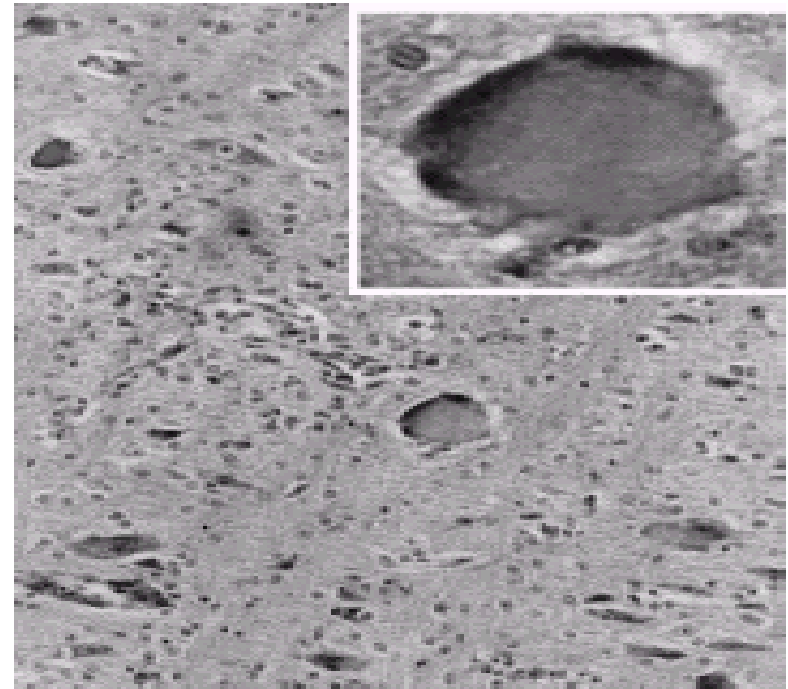


Granuloma

HISTOPATOLOGIA

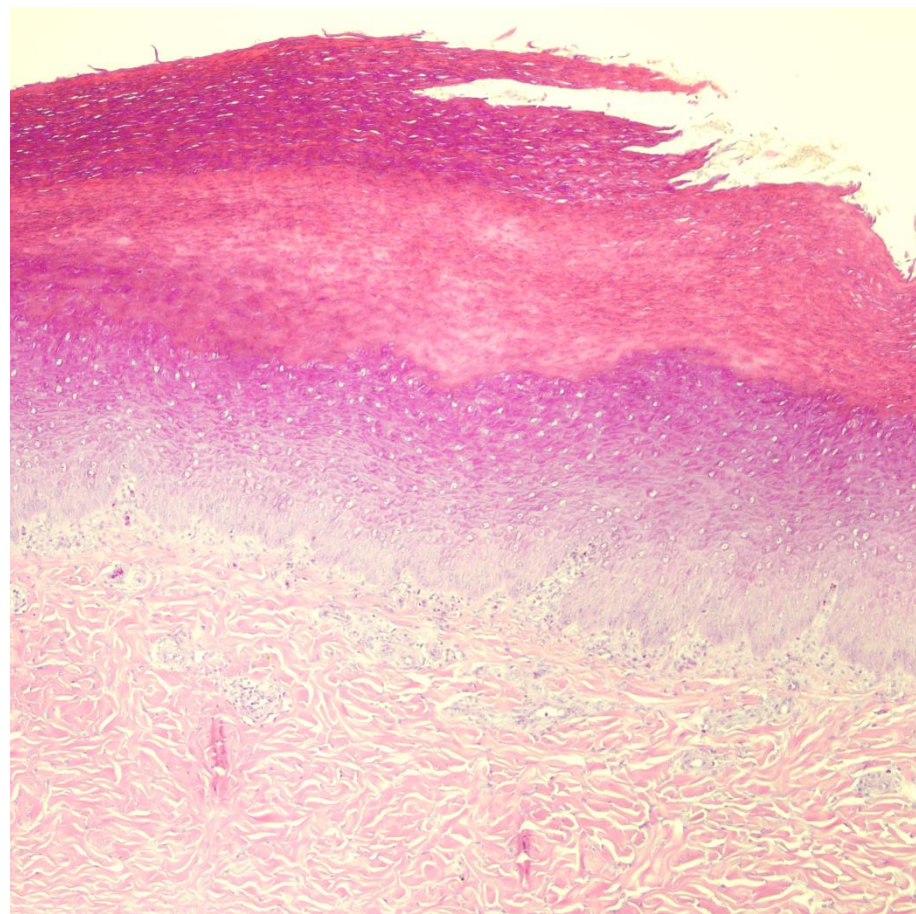


Bouba Aviária

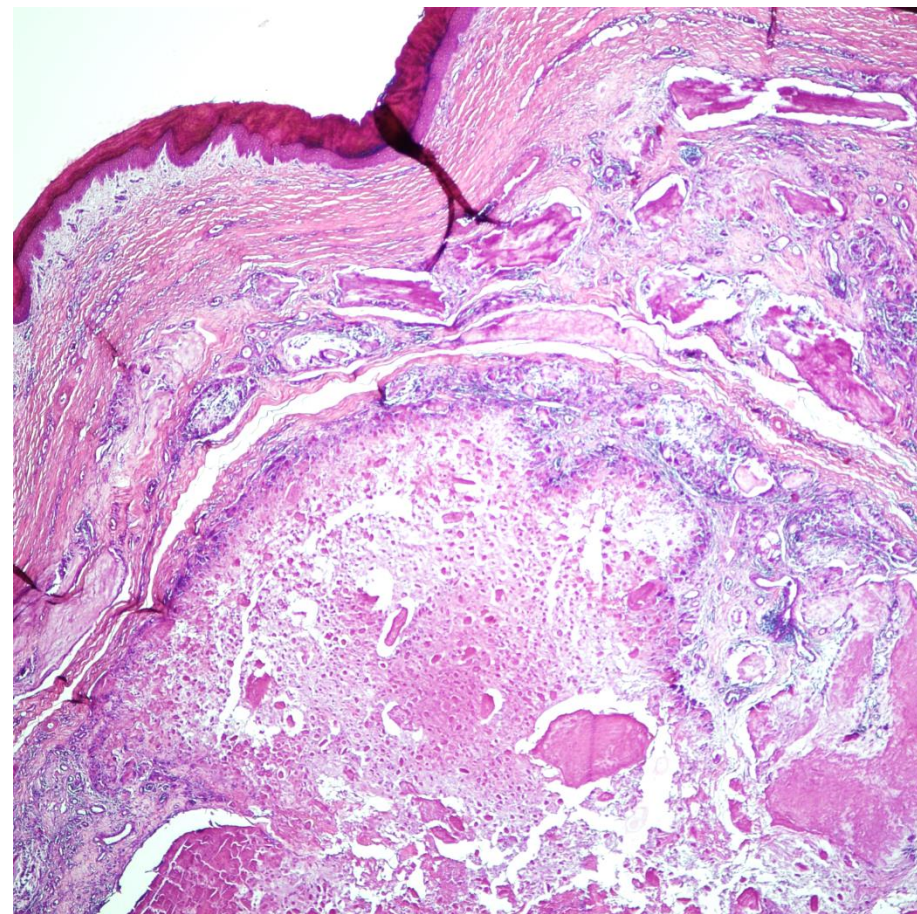


Encefalomyelite Aviária

HISTOPATOLOGIA

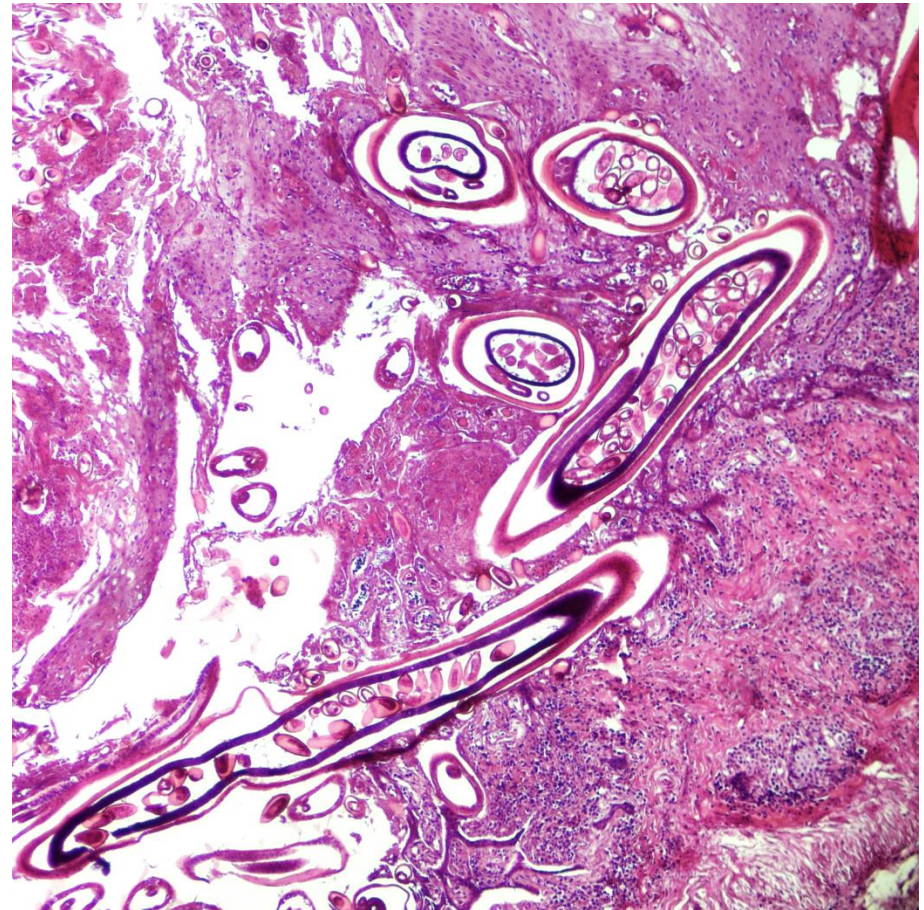
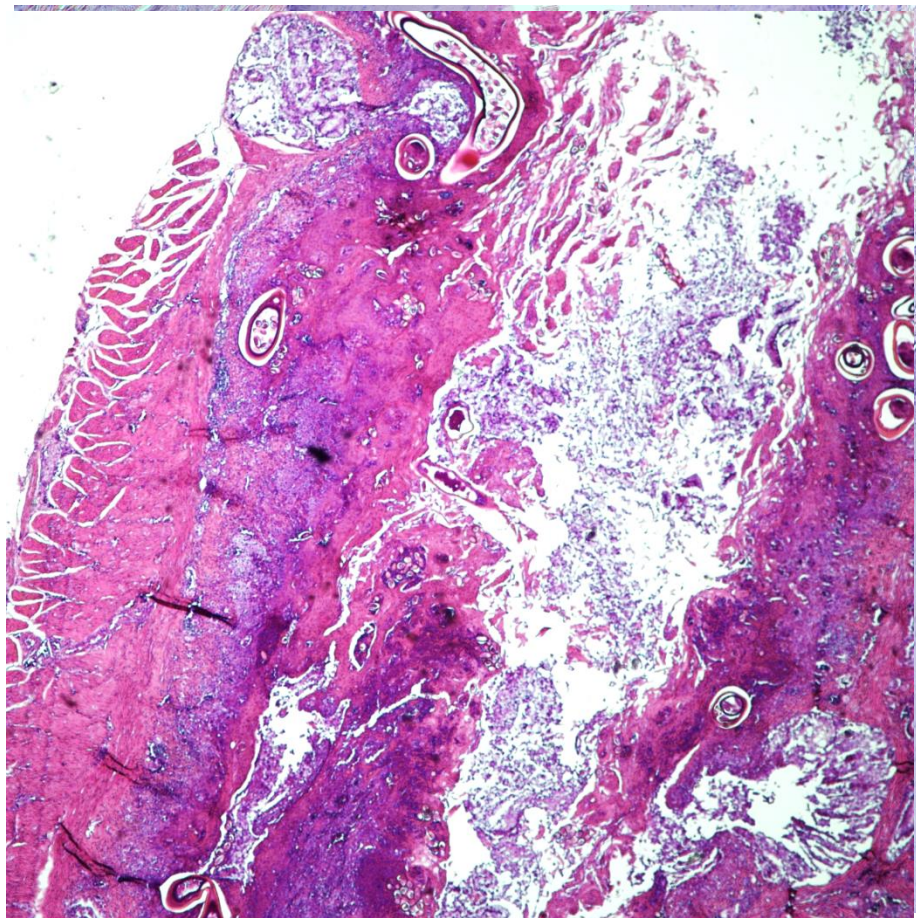


Pele normal



Gota

HISTOPATOLOGIA

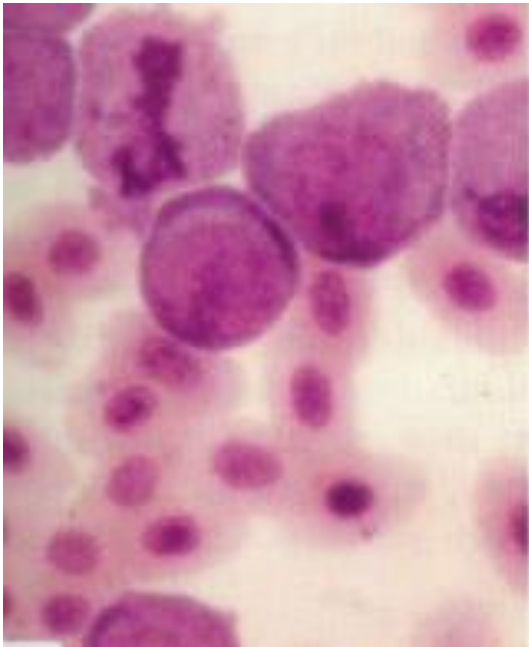


Papo- Capilaria

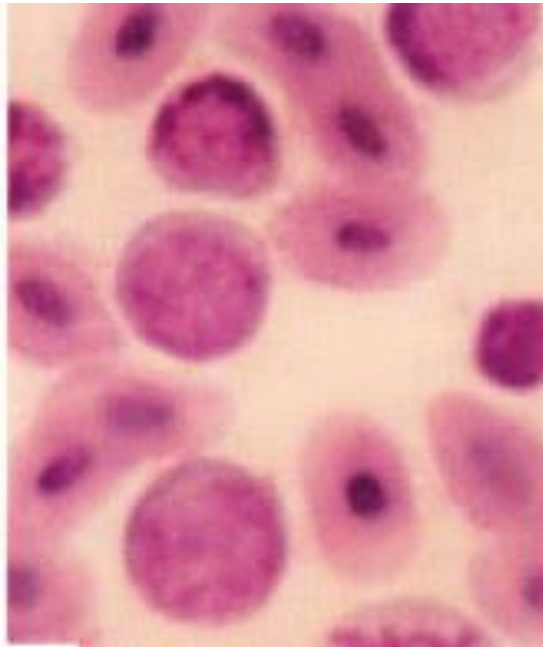
EXAMES LABORATORIAIS

- Exames sorológicos
- Hematologia / Bioquímica sérica
- Isolamento e identificação de vírus/bactérias/fungos
- Isolamento / Pesquisa de Protozoários
- Pesquisa de endo/ectoparasitos
- Exame histopatológico / Citológico
- Microscopia eletrônica
- Detecção de antígenos
- Detecção de toxinas
- Amplificação de DNA/RNA

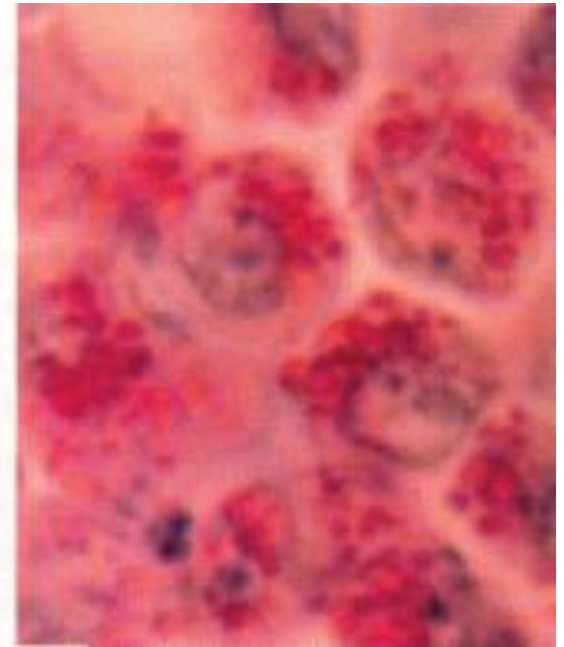
CITOLOGIA



Eritroblastose

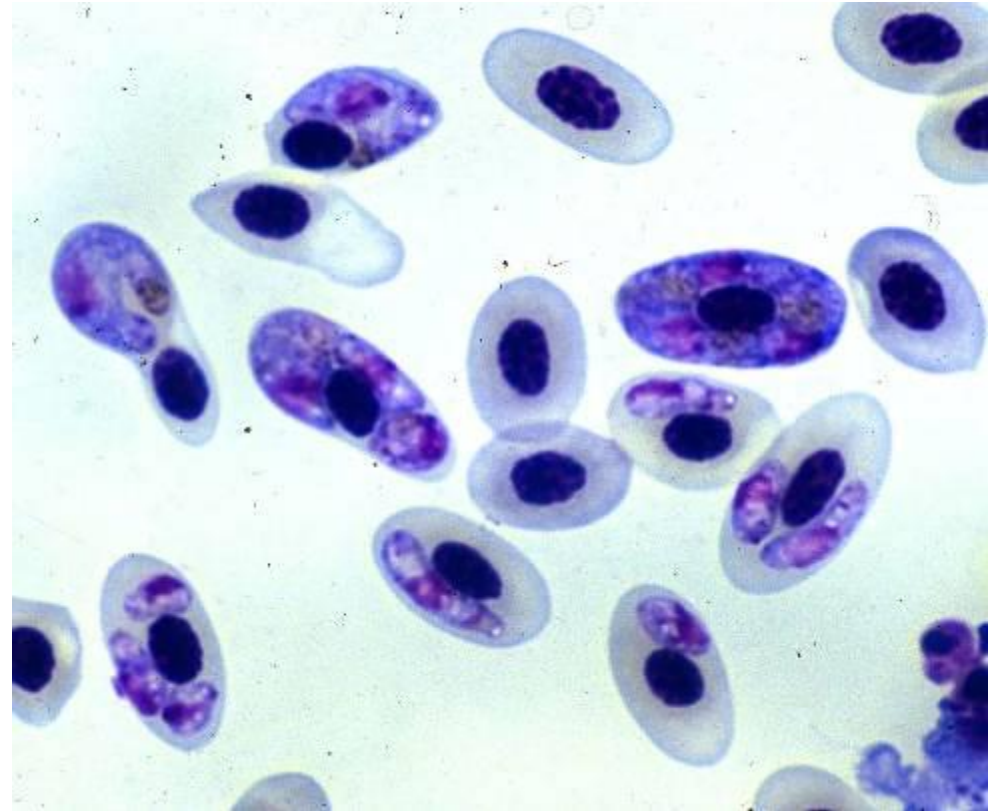


Mieloblastose



Mielocitomatose

CITOLOGIA



Haemoproteus columbae

PREPARO DO INÓCULO



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- Buscar o patógeno (ou seus efeitos)
- Buscar a resposta do organismo
 - especialmente anticorpos

ISOLAMENTO VIRAL

1. Cultivo celular

Efeitos citopáticos (CPE)

Hemabsorção

Imunodeteção

2. Ovos embrionados

Lesões na CAM

Hemaglutinação

Corpúsculos de inclusão

3. Animais

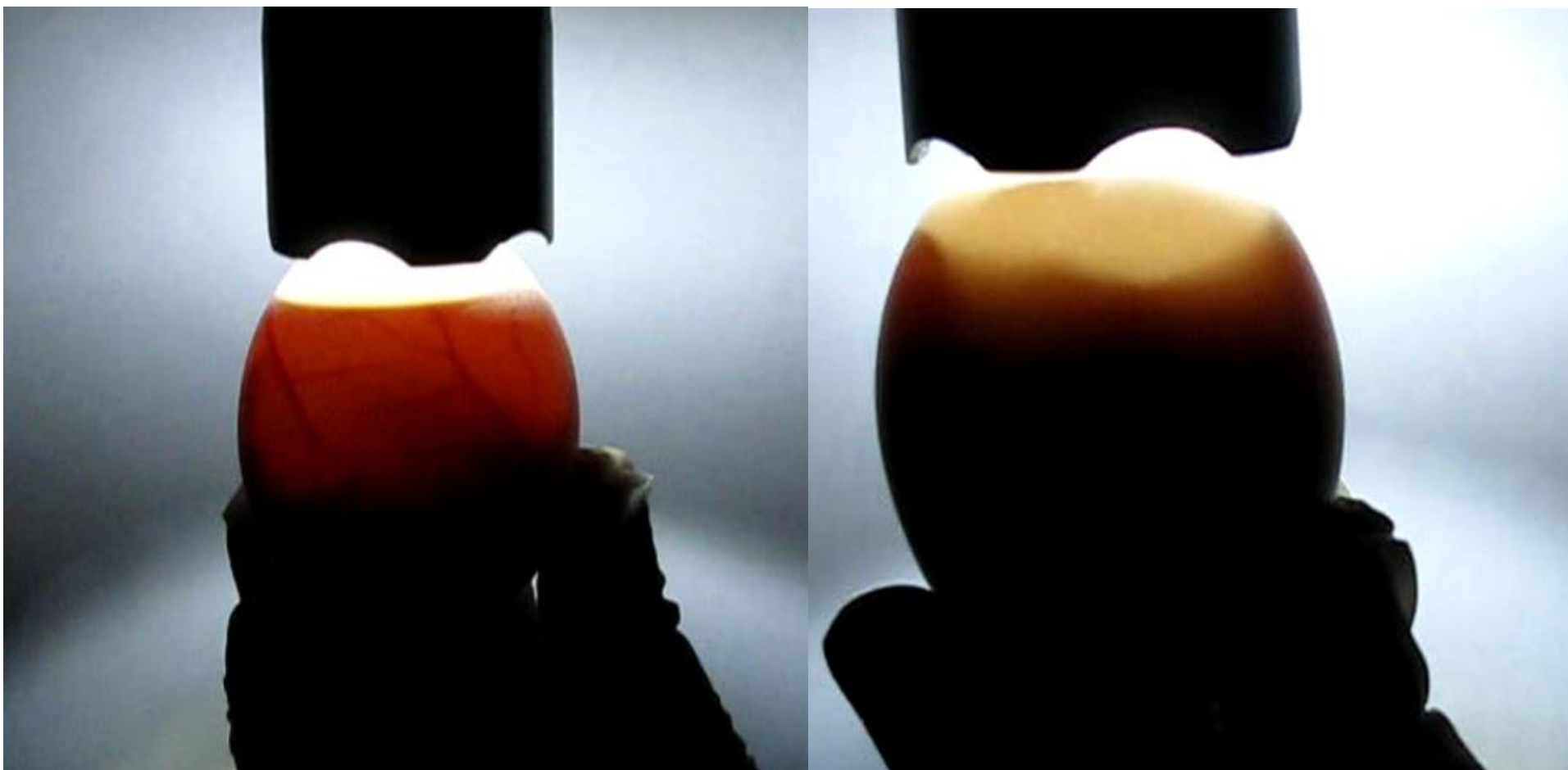
Doença ou morte

ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



ISOLAMENTO VIRAL

- Inoculação em animais
- Inoculação em ovos embrionados
- Cultivos celulares
 - 3 tipos
 - Métodos imunoquímicos



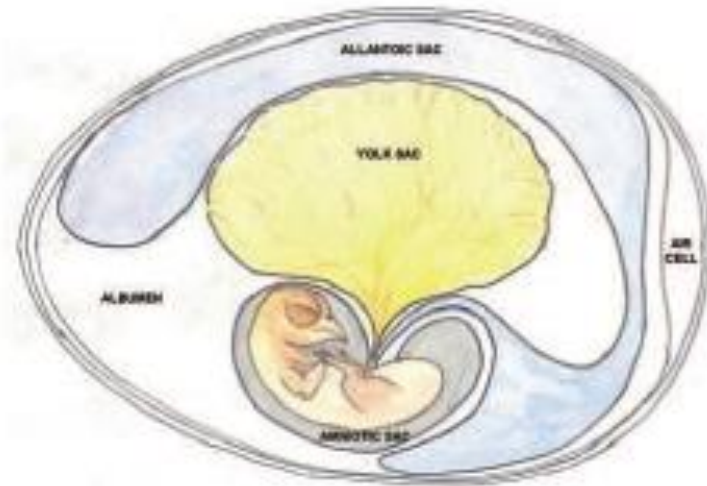
Diagnóstico

Diagnóstico

ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



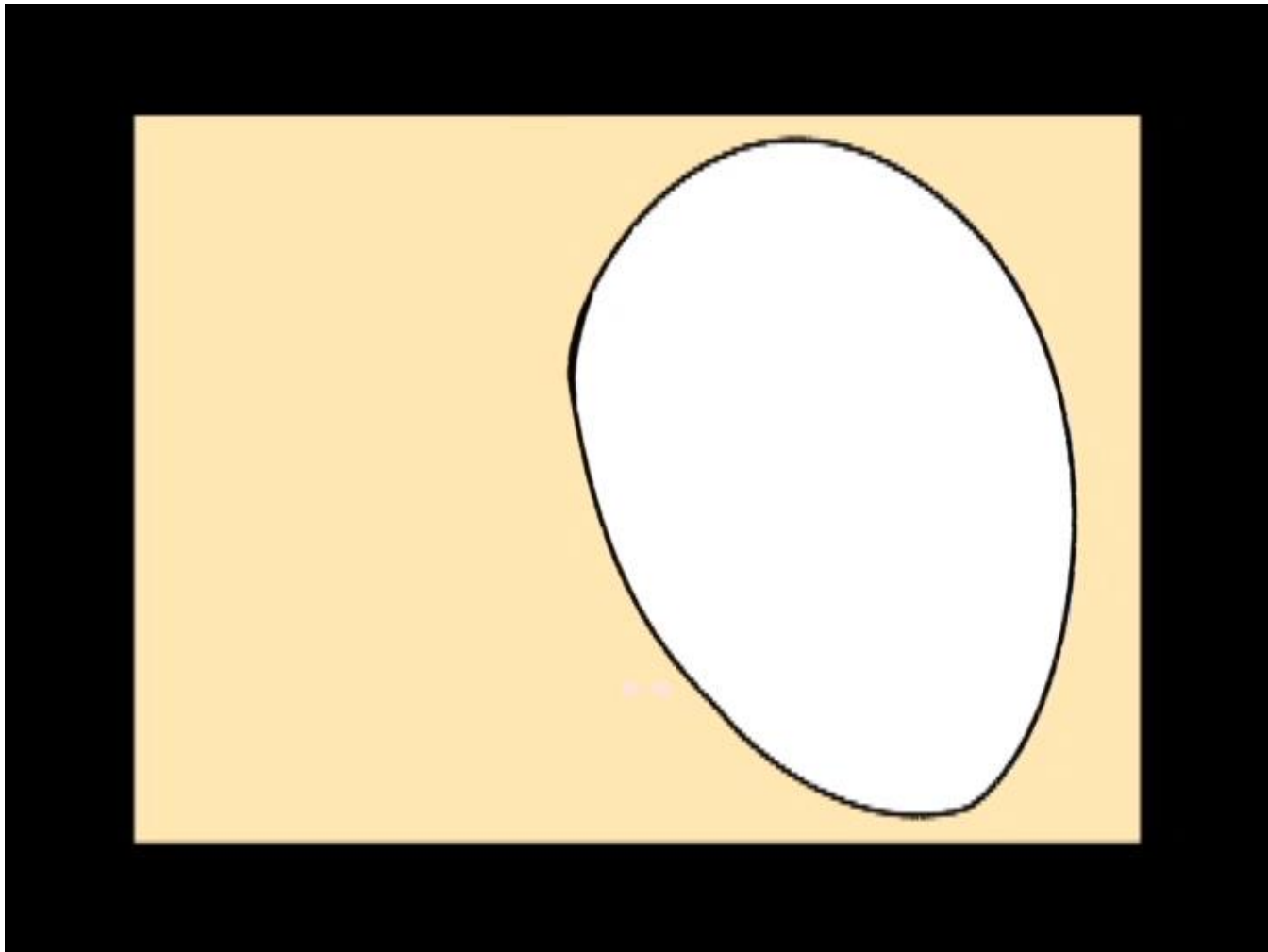
d

<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=candling-eggs>

<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=egg-inoculation>

<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=aaf-collection-dead-embryos>

ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



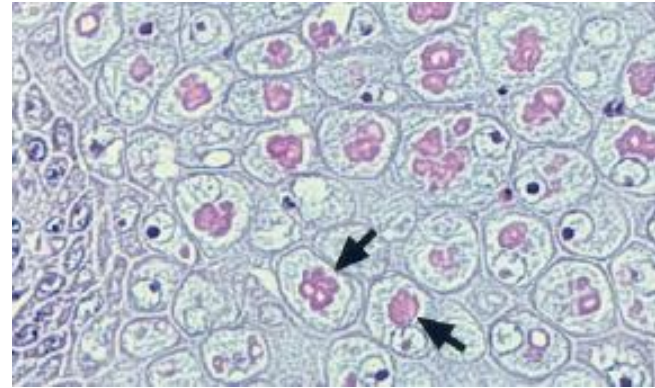
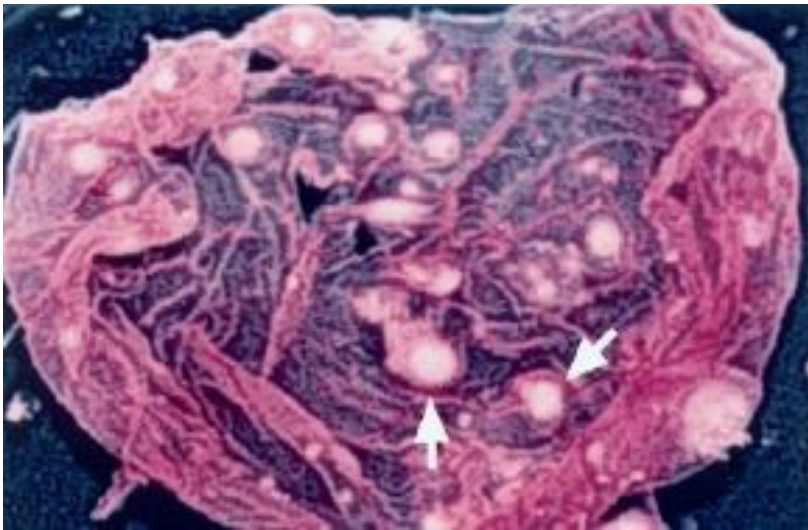
ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS

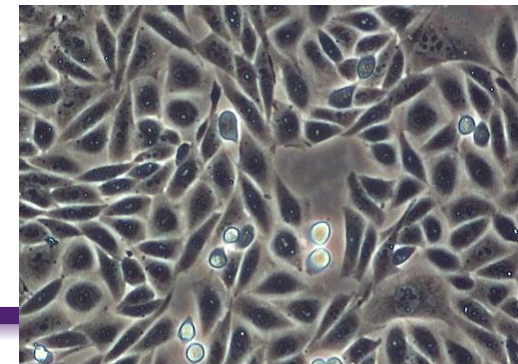
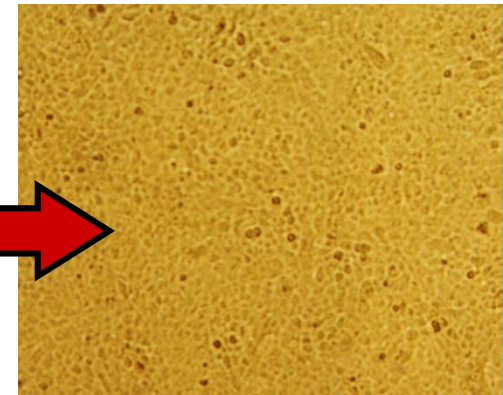


ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



Avipoxvirus

ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR



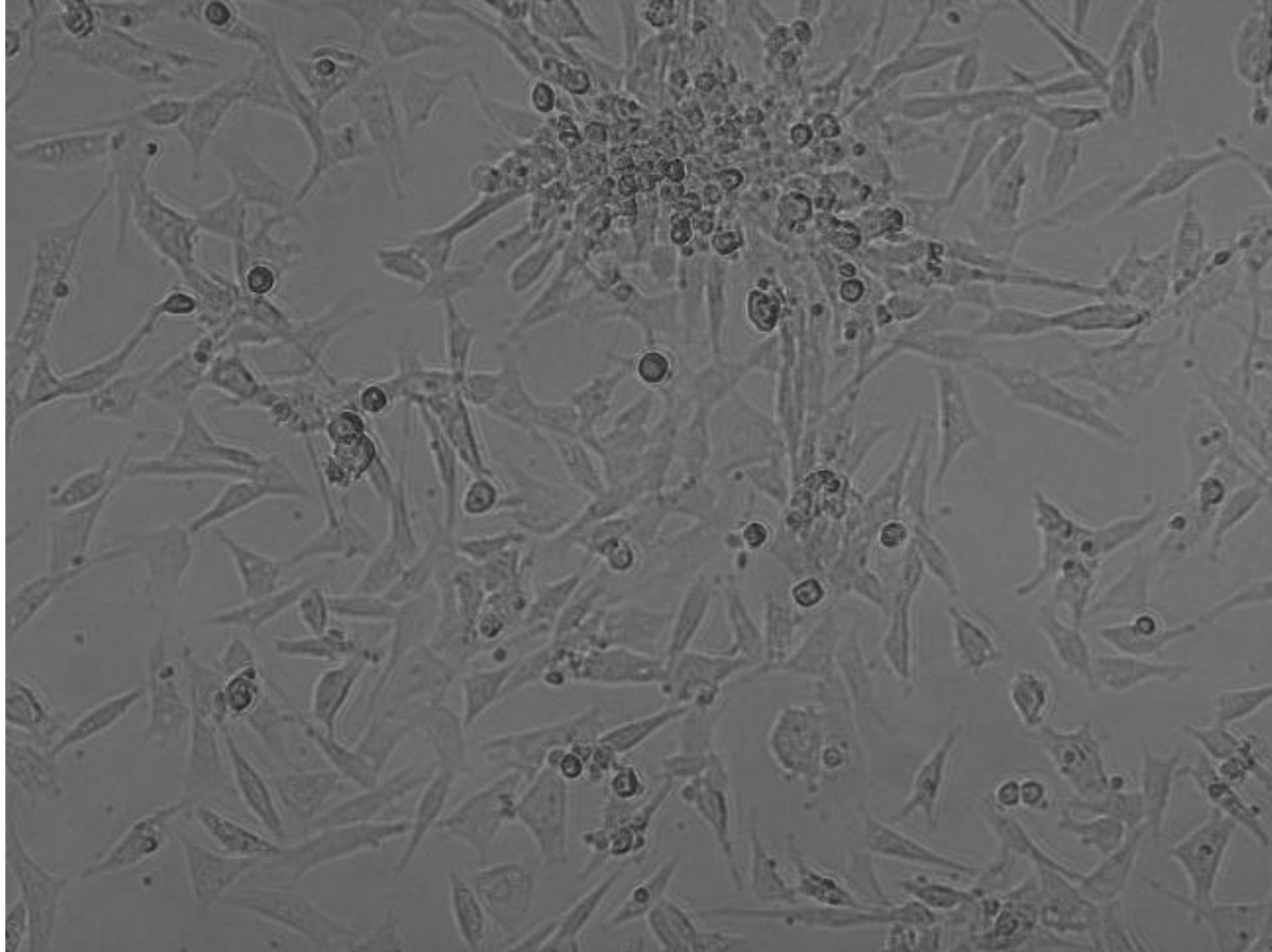
ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR

- Cultivos primários (células diplóides)
- Linhas celulares
 - Cultivo semi contínuo
 - Diplóide, 40 passagens
 - Cultivo contínuo
 - Número de passagens indefinido

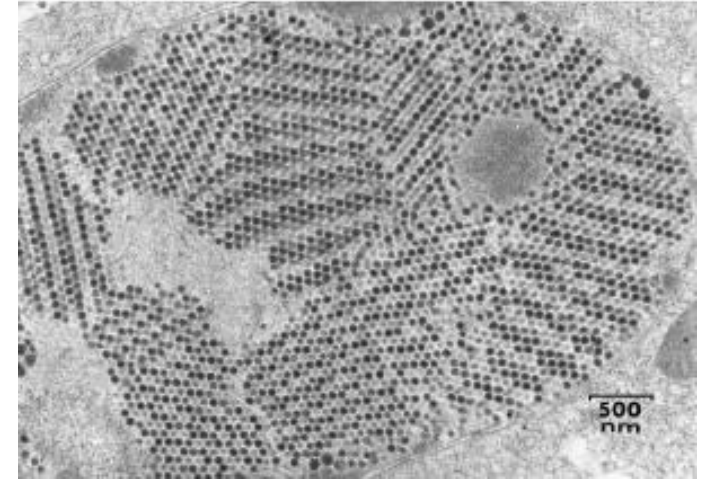
ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR

- EFEITO CITOPÁTICO
- É o dano que o vírus causa à célula !
 - Lise
 - Arredondamento
 - Vacuolização
 - Formação de sincícios
 - Inclusões
 - Picnose
 - Apoptose

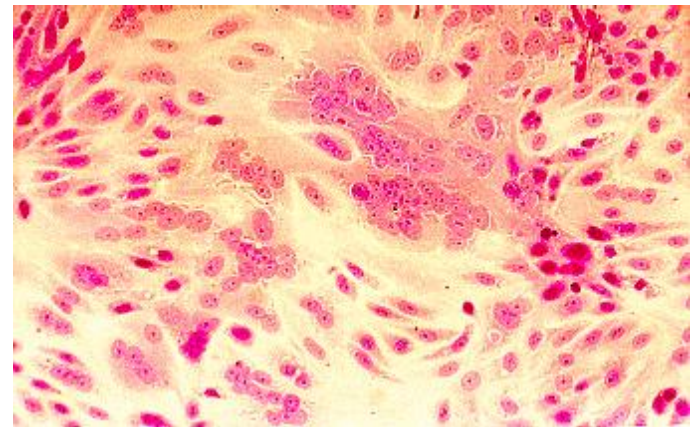
ISOLAMENTO VIRAL



ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR



Adenovirus – Células de Fígado



Formação de Sincícios

ISOLAMENTO VIRAL EM ANÉIS DE TRAQUEIA

Tracheal organ cultures

1. Embryo
tracheas . . .

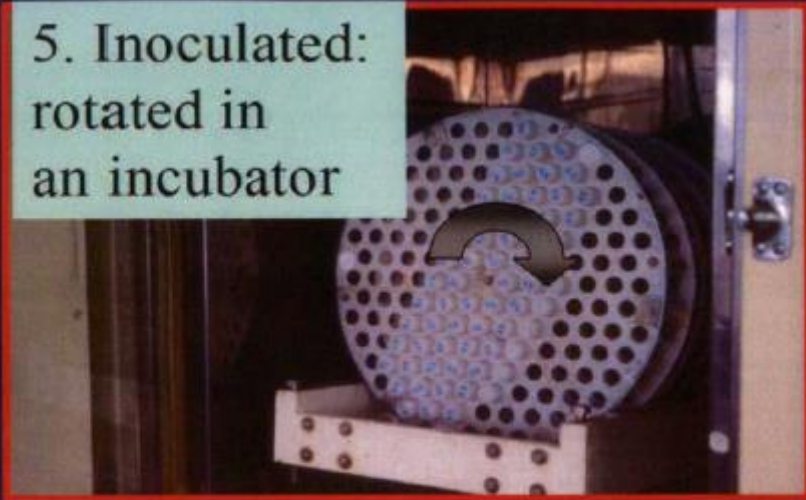
3. Put in tubes

2. Sliced. . .

4. With medium and inoculum

Courtesy of R C Jones, Liverpool University.

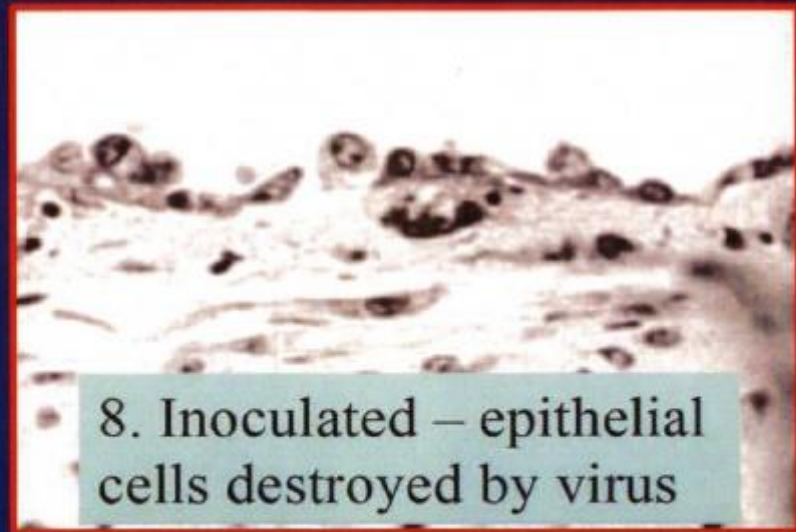
5. Inoculated:
rotated in
an incubator



7. Uninoculated – cilia active



6. Examined daily
for up to 6 or 7 days

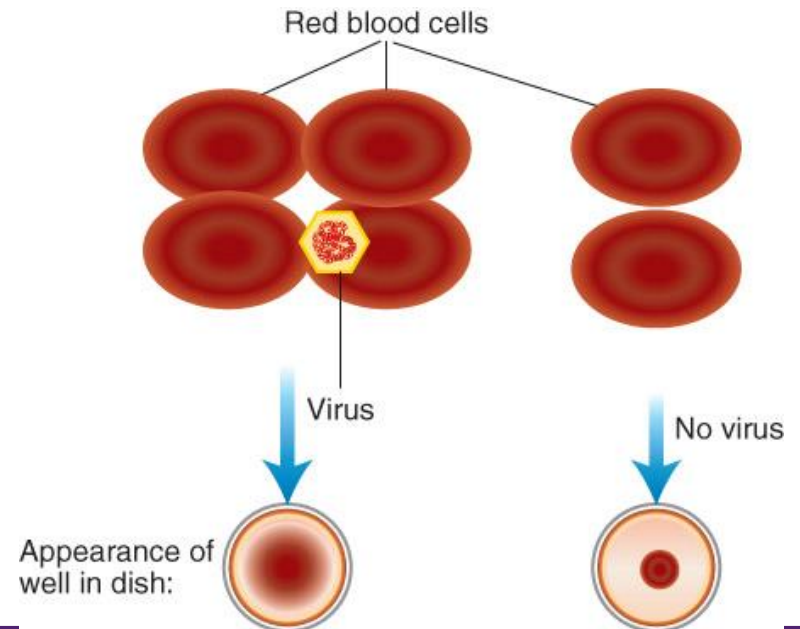


8. Inoculated – epithelial
cells destroyed by virus

Courtesy of R C Jones, Liverpool University

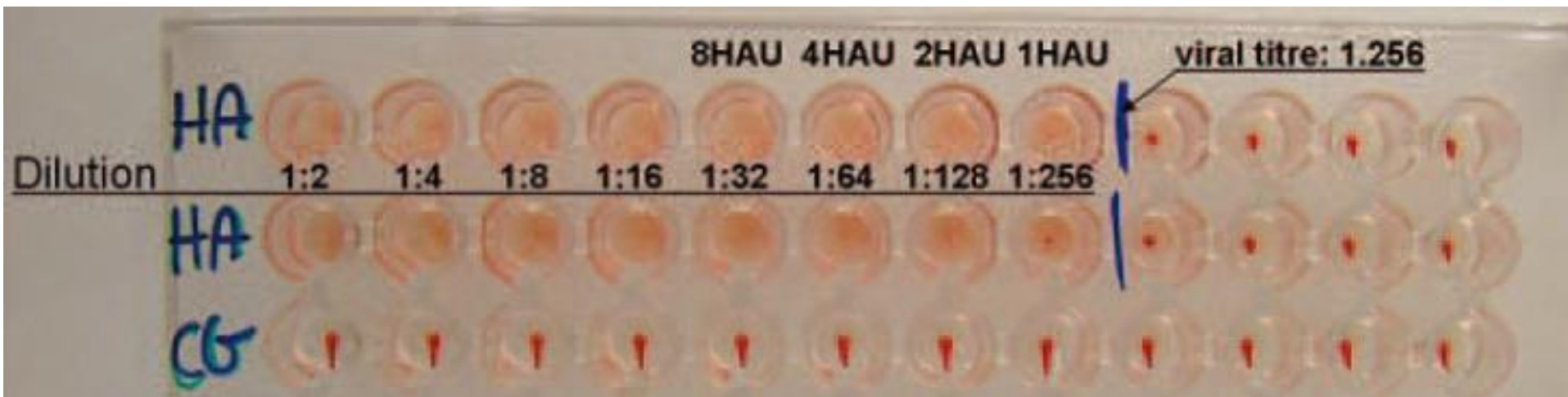
DETECÇÃO VIRAL

- Hemaglutinação (HA)
- **com vírus**
 - RBC se entrelaçam e aderem às paredes
- **Sem vírus**
 - Sedimentam RBC



DETECÇÃO VIRAL

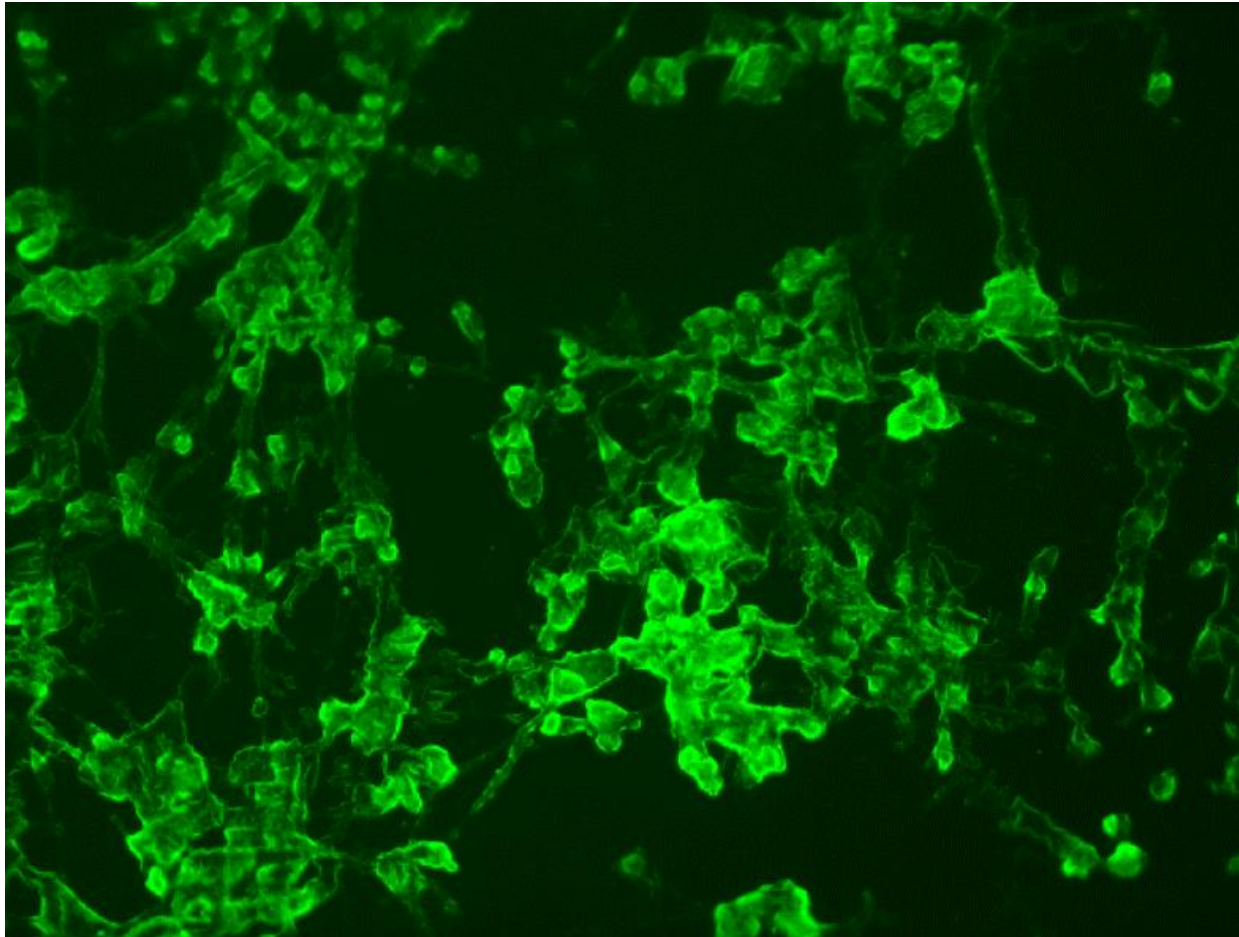
■ Hemaglutinação (HA)



<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=ha-test>

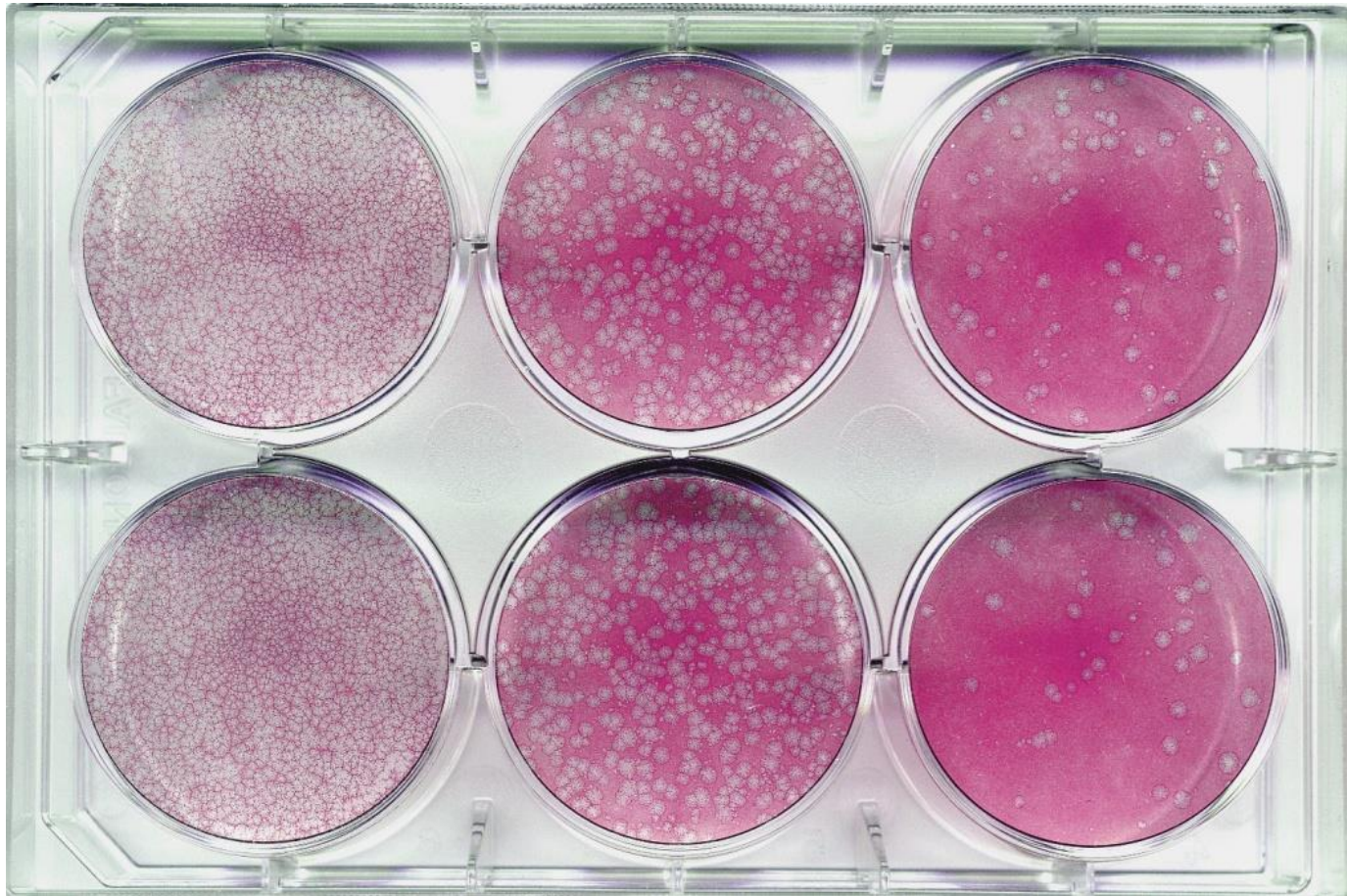
<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=ha-test-results>

DETECÇÃO VIRAL



IFA – VERO infectadas com NDV

DETECÇÃO VIRAL



PFU

ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE BACTÉRIAS



Salmonella sp. – Ágar SS



Escherichia coli – Ágar MacConkey



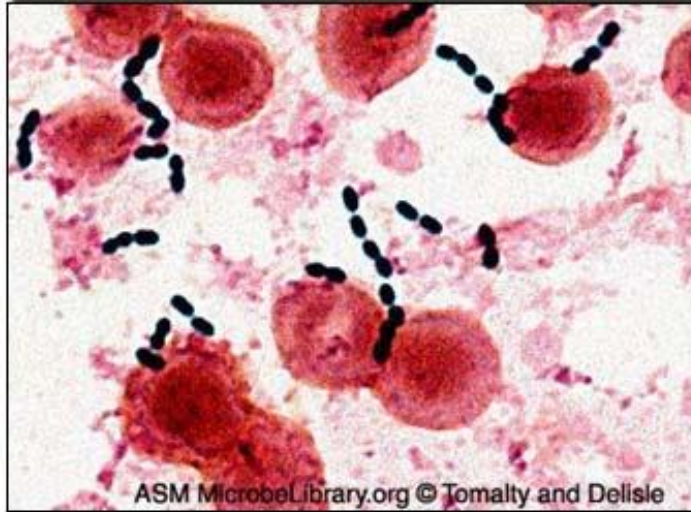
Testes Bioquímicos



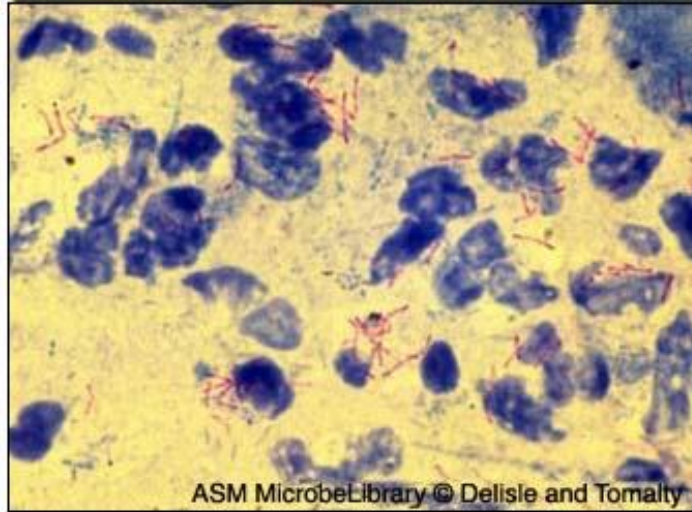
Ágar Tríplice Acúcar Ferro

ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

Gram stain of *Enterococcus faecalis*



Z-N stain of *Mycobacterium tuberculosis*



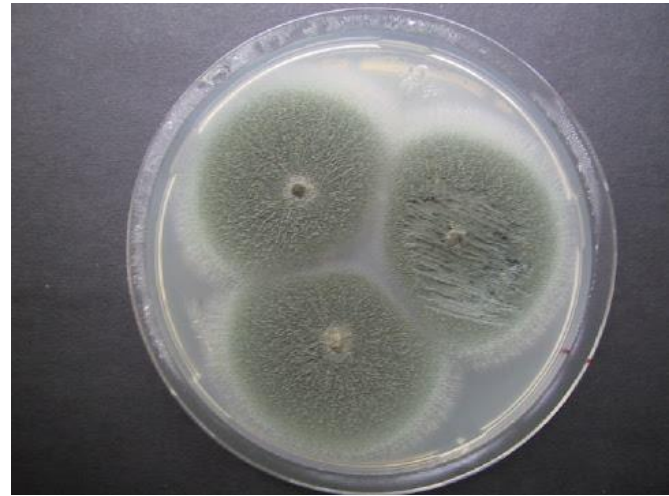
Gram stain of *Salmonella* sp.



ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE FUNGOS



Aspergillus flavus

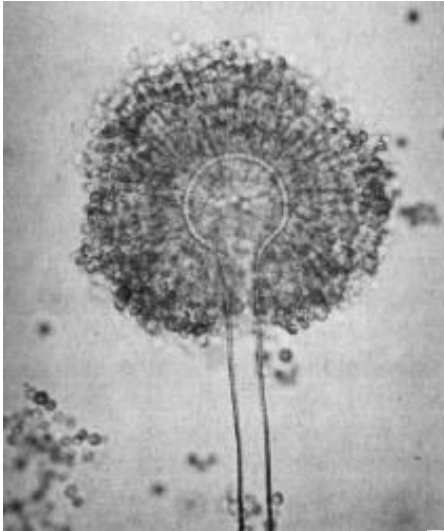


Aspergillus fumigatus

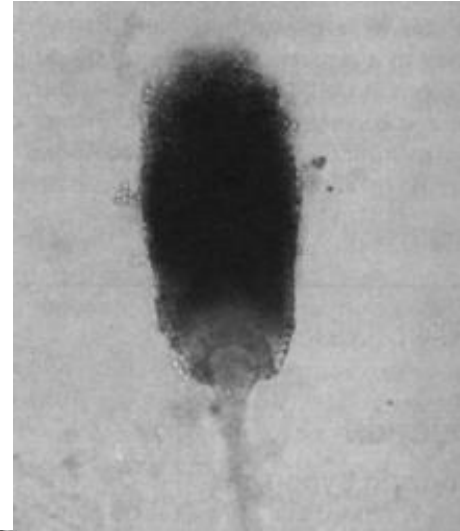


Aspergillus parasiticus

ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE FUNGOS



Aspergillus flavus

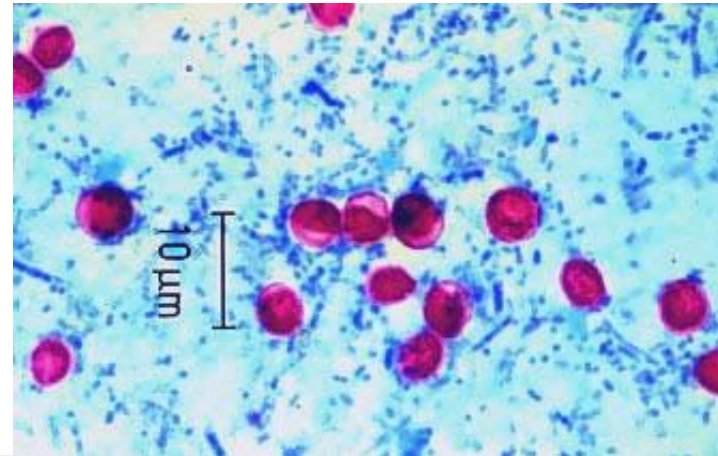
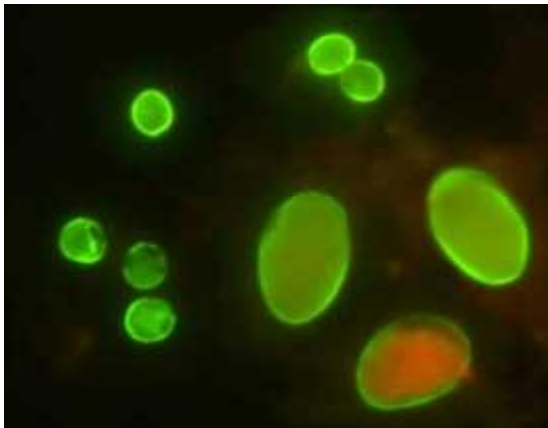


Aspergillus fumigatus



Aspergillus flavus

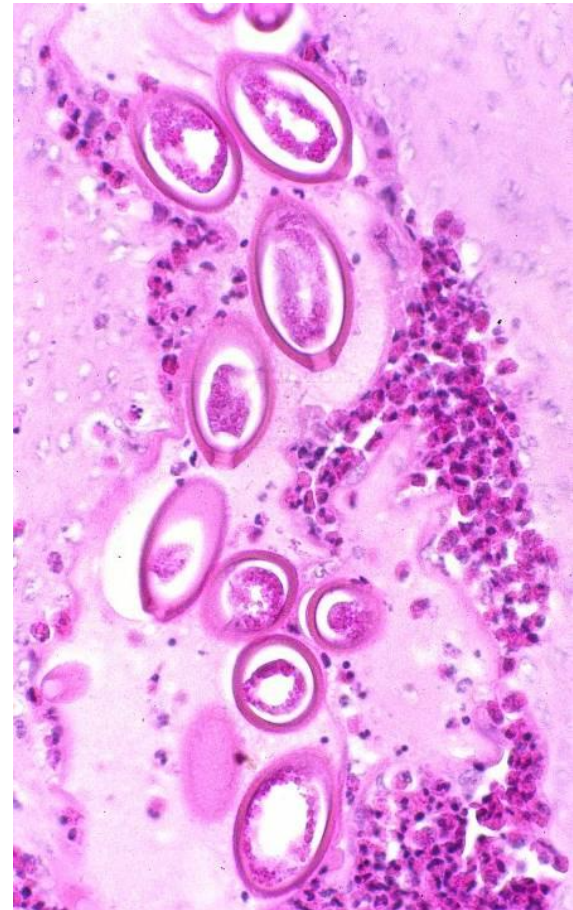
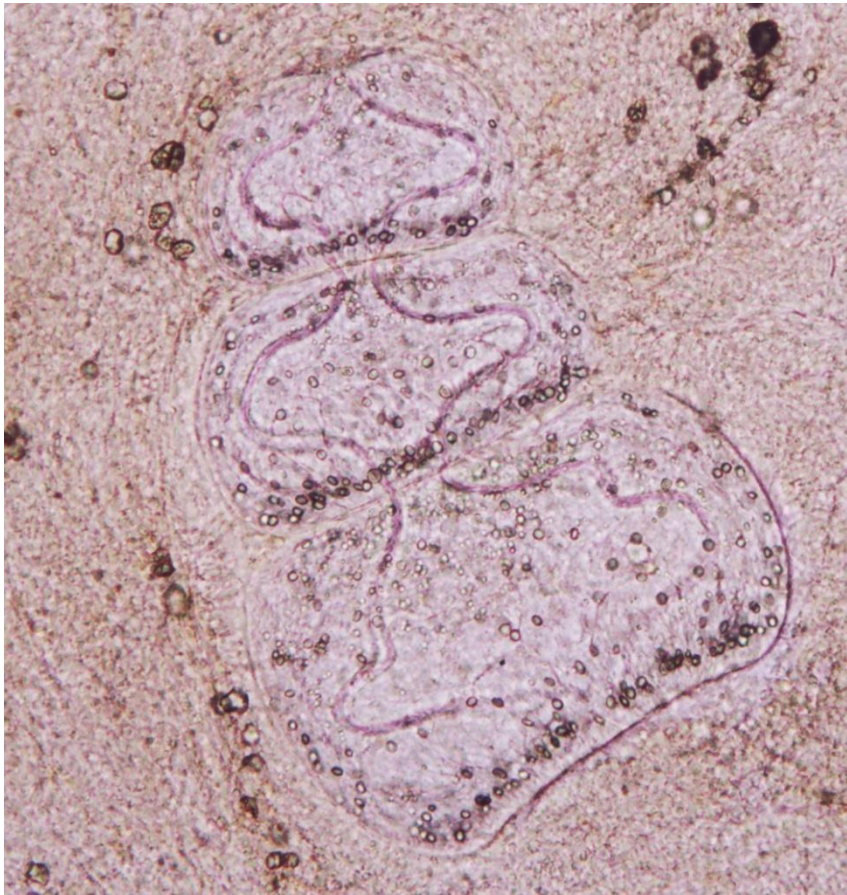
IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS



IDENTIFICAÇÃO DE ENDOPARASITOS



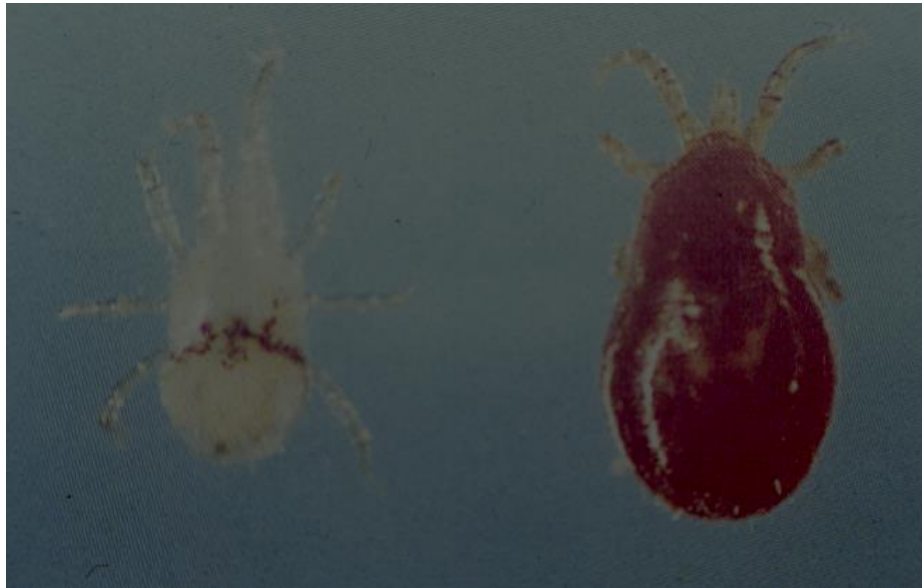
IDENTIFICAÇÃO DE ENDOPARASITOS



IDENTIFICAÇÃO DE ENDOPARASITOS



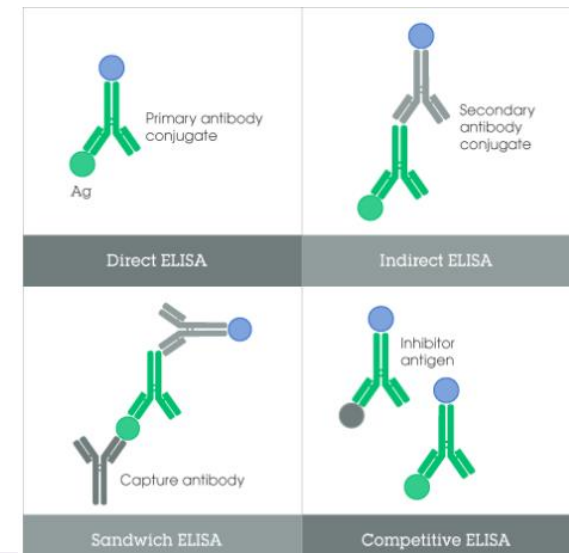
IDENTIFICAÇÃO DE ECTOPARASITOS



TESTES PARA A DETECÇÃO DE ANTÍGENOS

A detecção de antígenos pode ser realizada utilizando diferentes técnicas a partir de amostras clínicas ou isolados de culturas (virais, bacterianas, fúngicas).

- 1- Testes de neutralização
- 2- Técnicas de IF ou IPX
- 3- Imunoprecipitação em Ágar Gel
- 4- Inibição da hemaglutinação
- 5- ELISA
- 6- Western Blot



DETEÇÃO DO AGENTE (DIRETO)

1. Microscopia eletrônica

de transmissão ou varredura

morfologia dos agentes

2. Detecção do antígeno

imunofluorescência, ELISA, IHC etc.

3. Microscopia de luz

Histopatologia

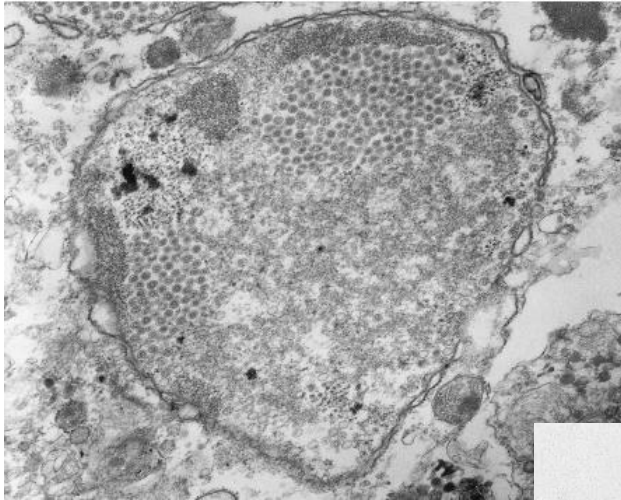
Corpúsculo de inclusão

4. Detecção do genoma

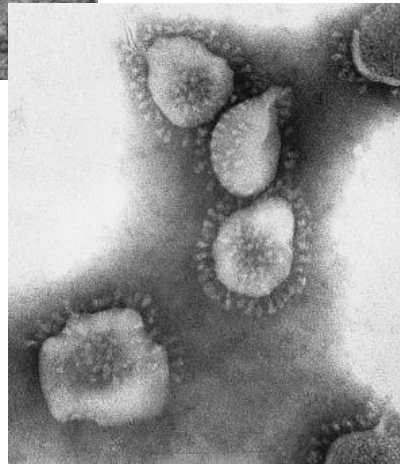
Hibridização com sondas

específicas de ácidos nucleicos PCR, RT-PCR

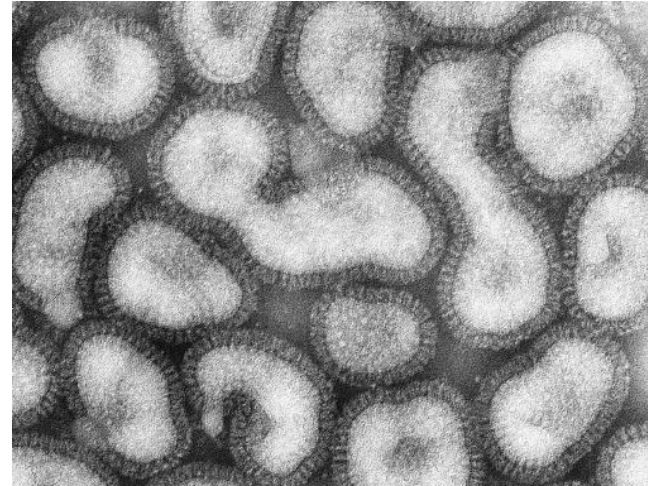
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO



Herpesvirus 1



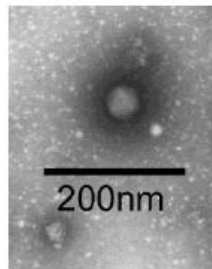
Coronavirus



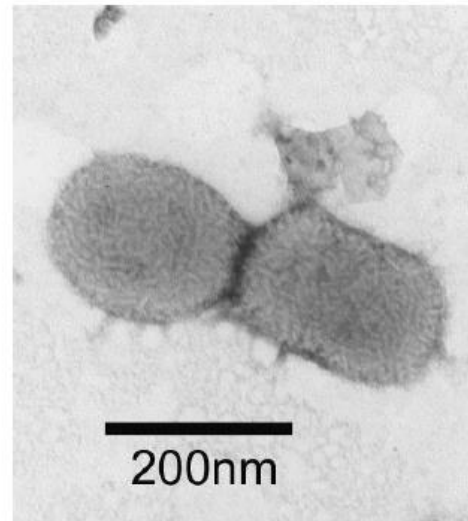
Influenzavirus A

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

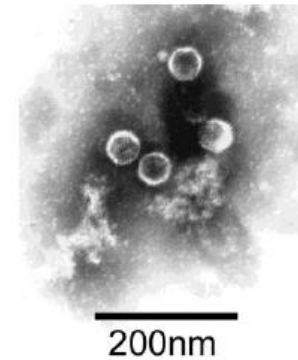
ADENOVIRUS



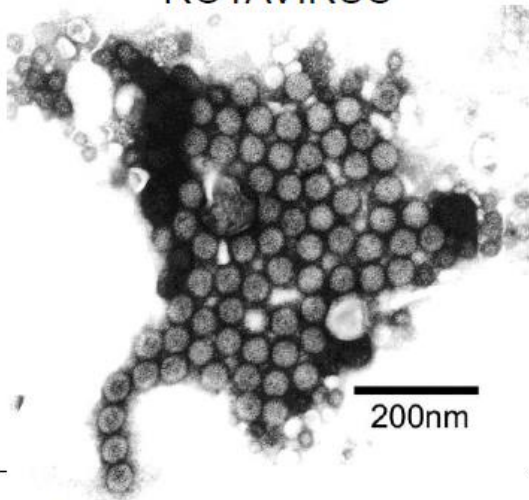
POXVIRUS



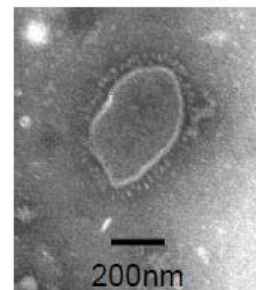
HERPESVIRUS



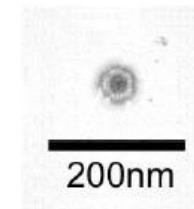
ROTAVIRUS



CORONAVIRUS

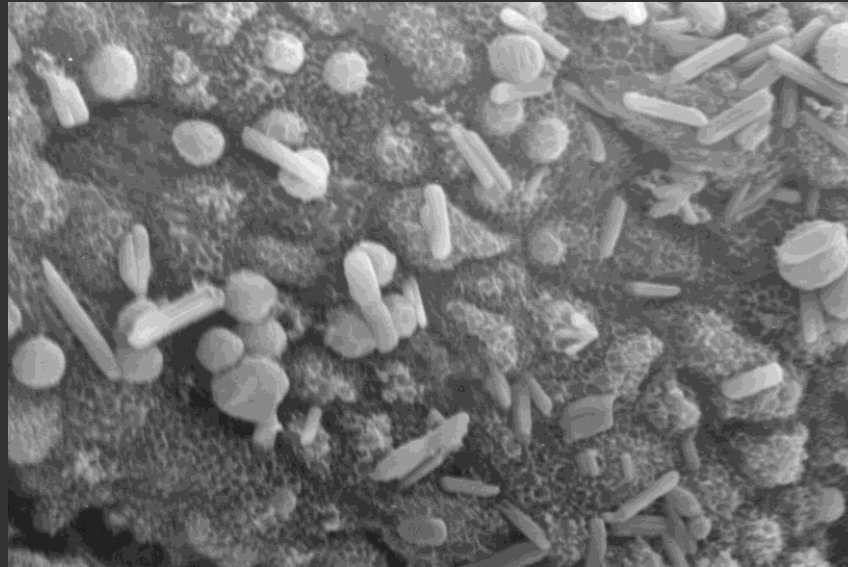


REOVIRUS



Taken by
Vanessa
Ceeraz

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

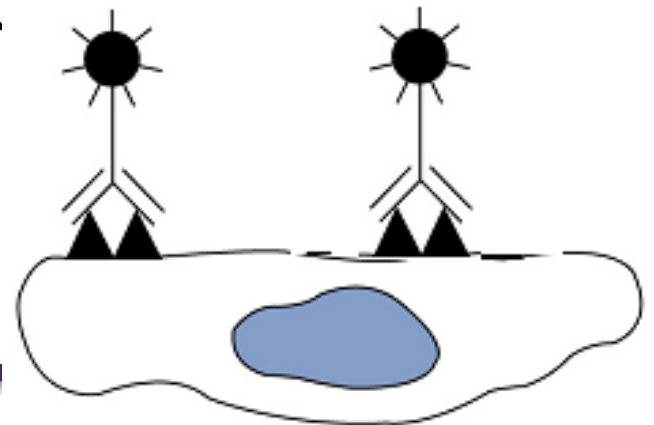


Traquéia mostrando colonização epitelial por E. coli e C. baileyi com perda severa de cílios. Grupo II, 13 dias de idade, 2000 X.

IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

○ Direta

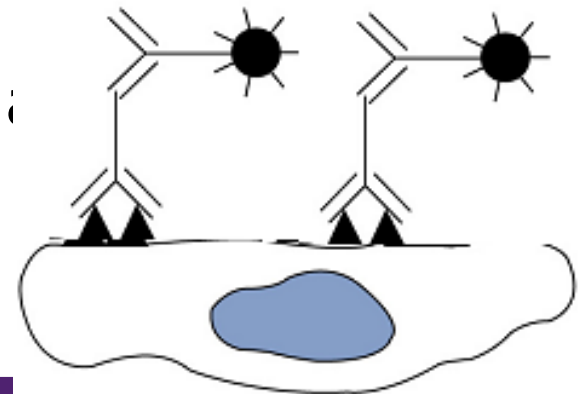
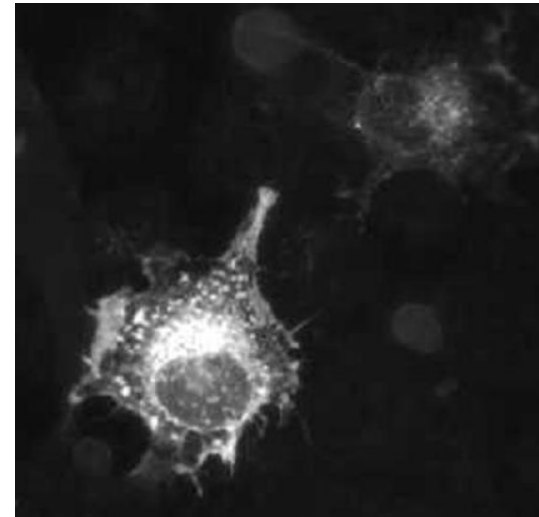
- Anticorpo marcado sobre material infectado
- Material infectado (suspeito)
- Anticorpo específico marcado com Peroxidase
- Luz UV ou luz branca



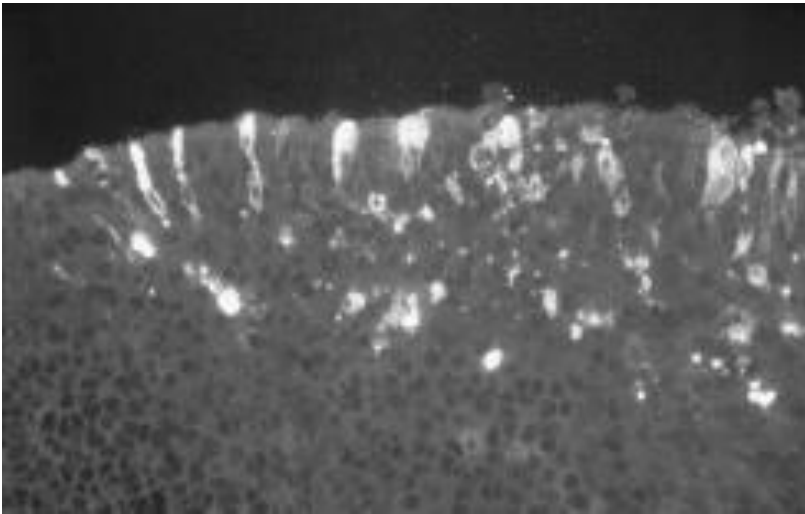
IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

○ Indireta

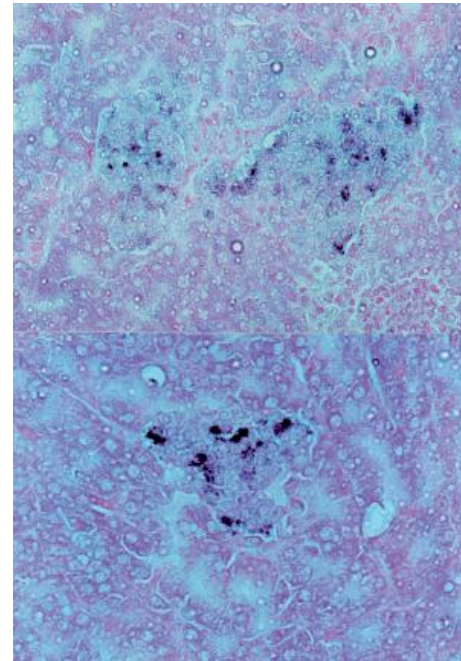
- Utilização de dois anticorpos
- Material infectado (células ou tecidos)
- Soro específico (ex: soro galinha)
- Conjugado anti-IgG específico (ex: anti-galinha ou Peroxidase)
- Luz UV ou Luz branca



IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

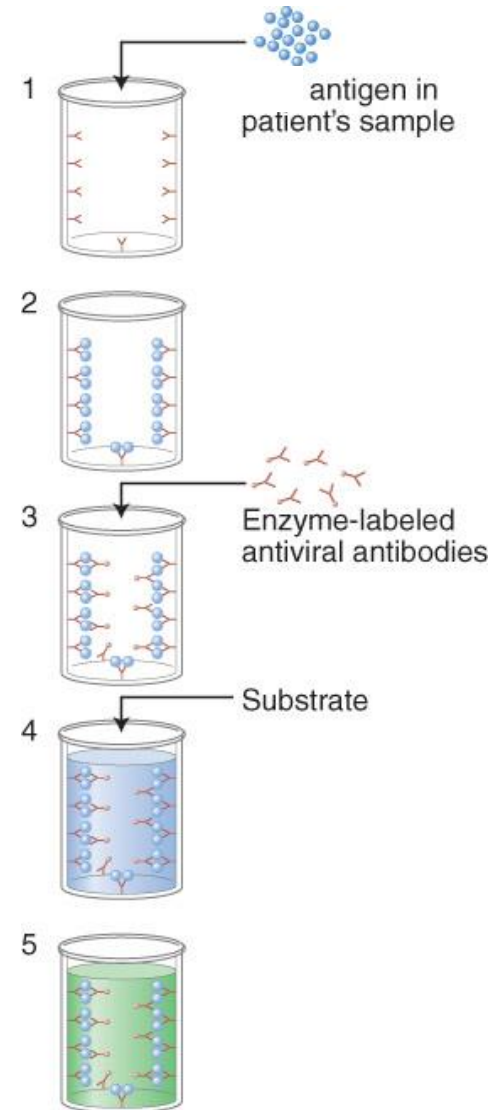
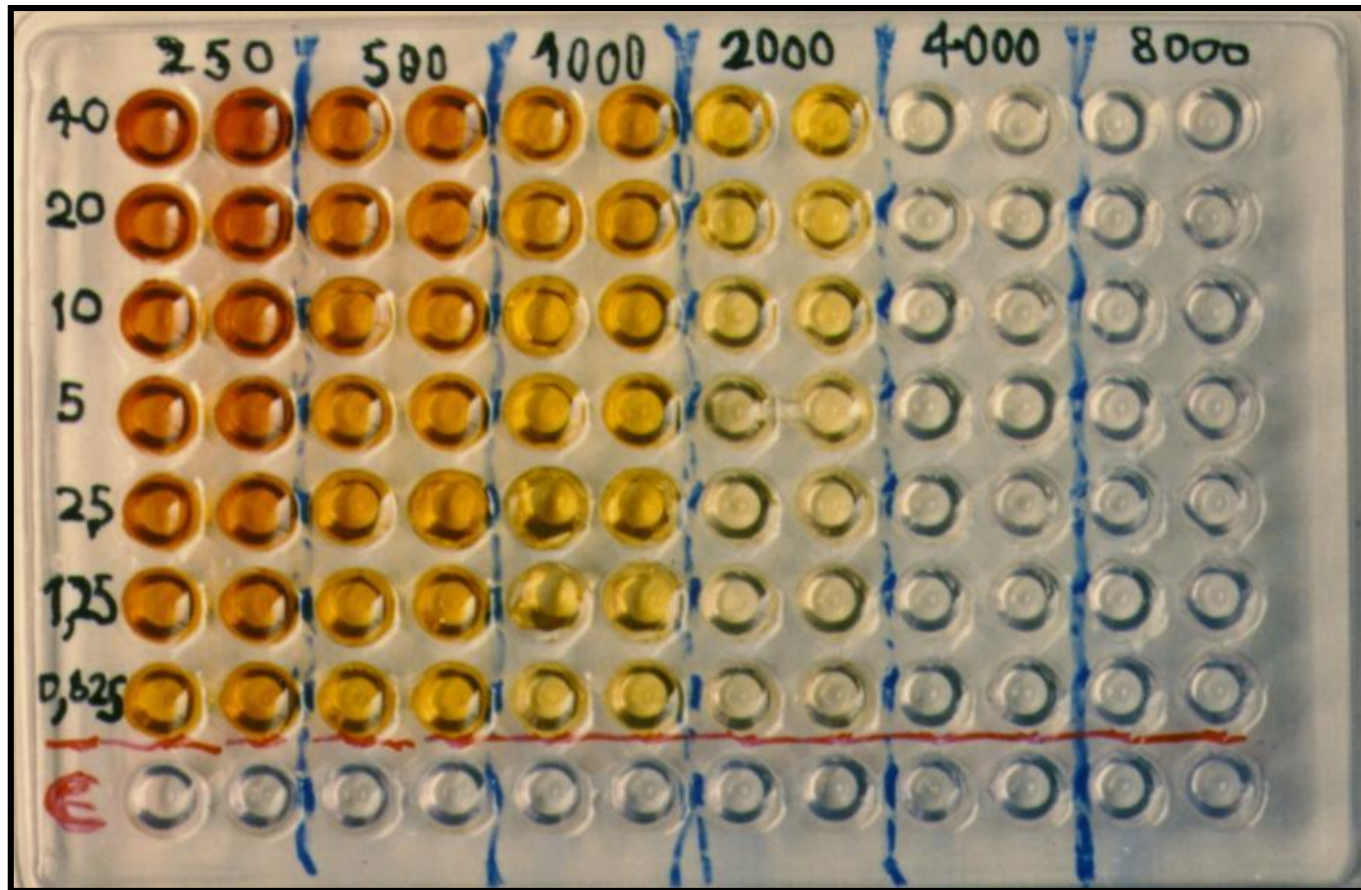


Coronavirus - Intestino

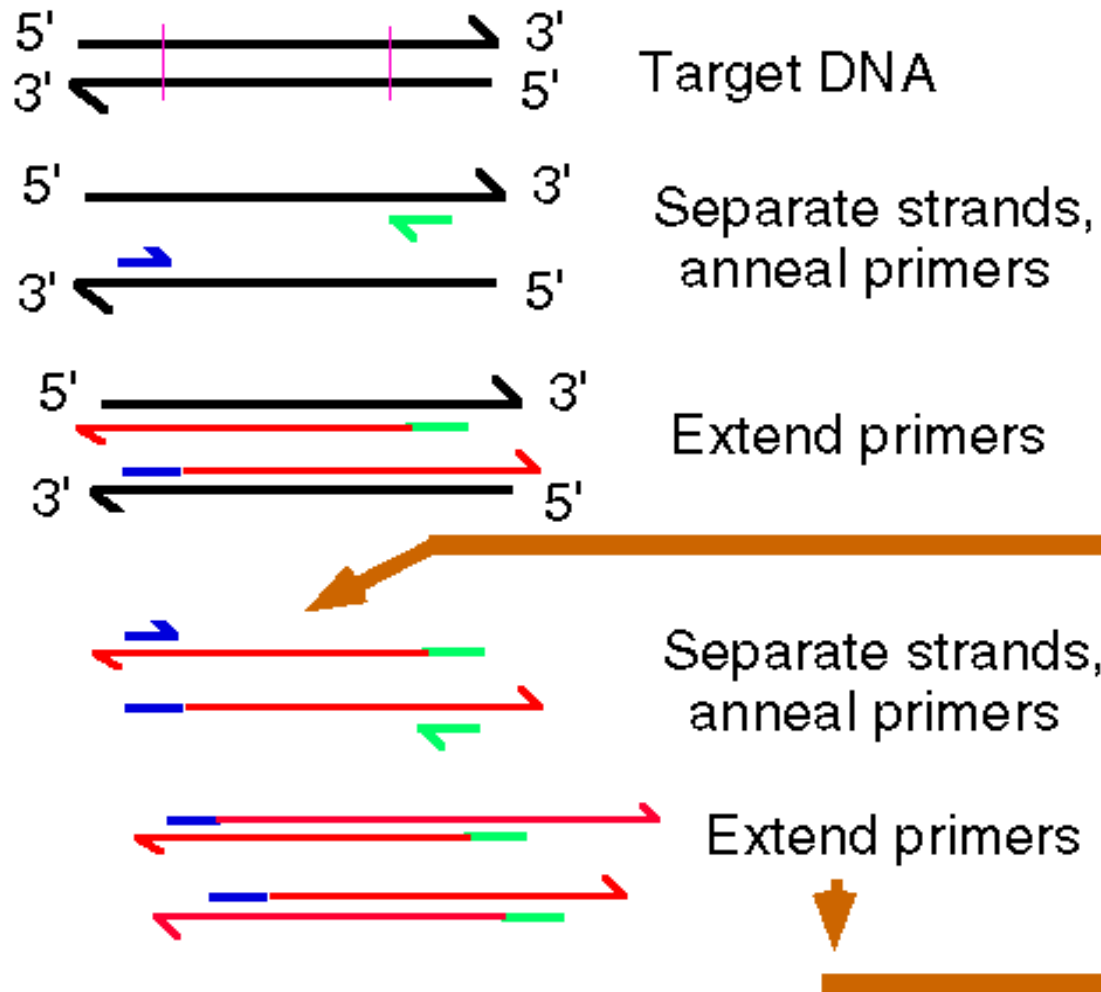


Adenovirus - Pâncreas

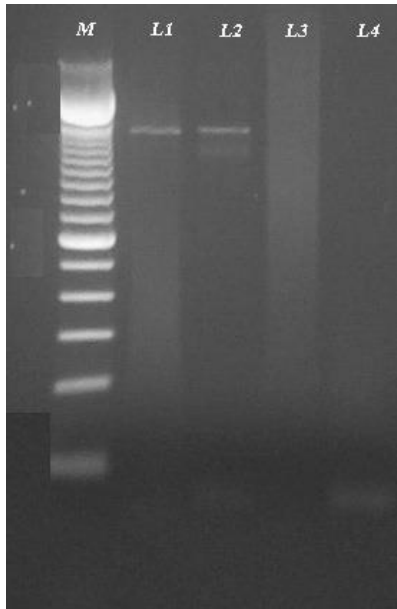
ELISA (DIRETO)



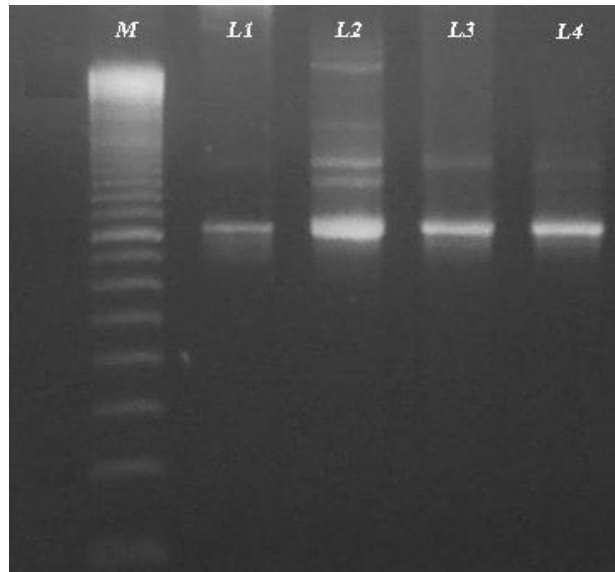
BIOTECNOLOGIA



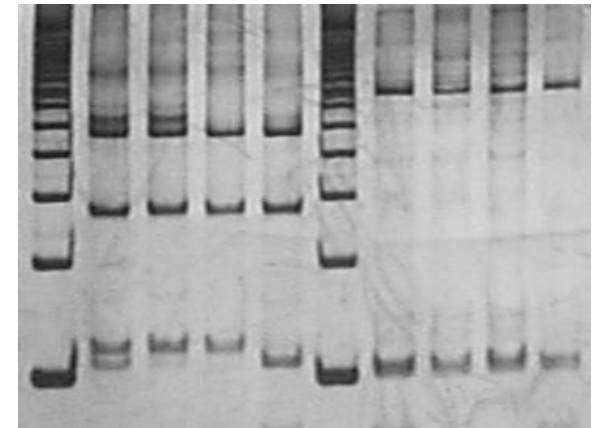
BIOTECNOLOGIA



PCR

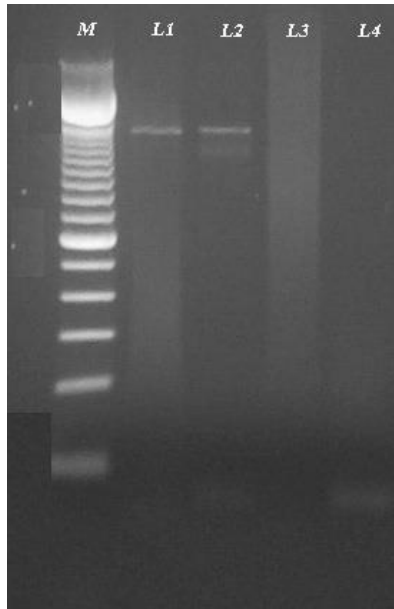


RT-PCR

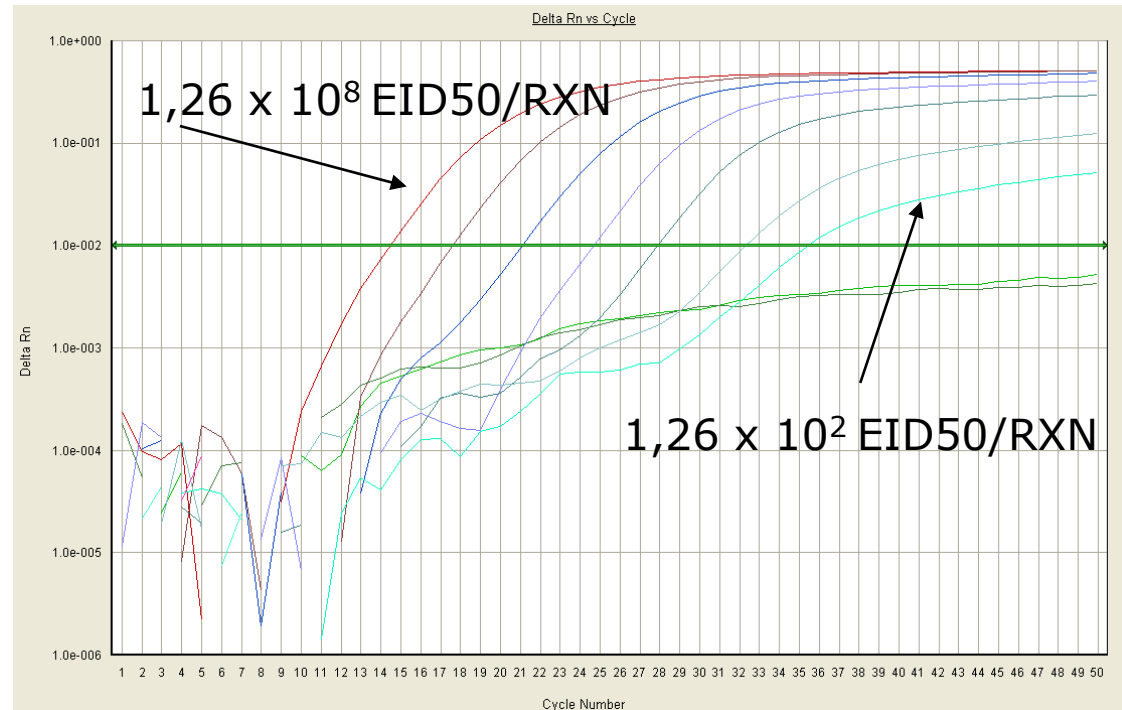


PCR-RFLP

BIOTECNOLOGIA

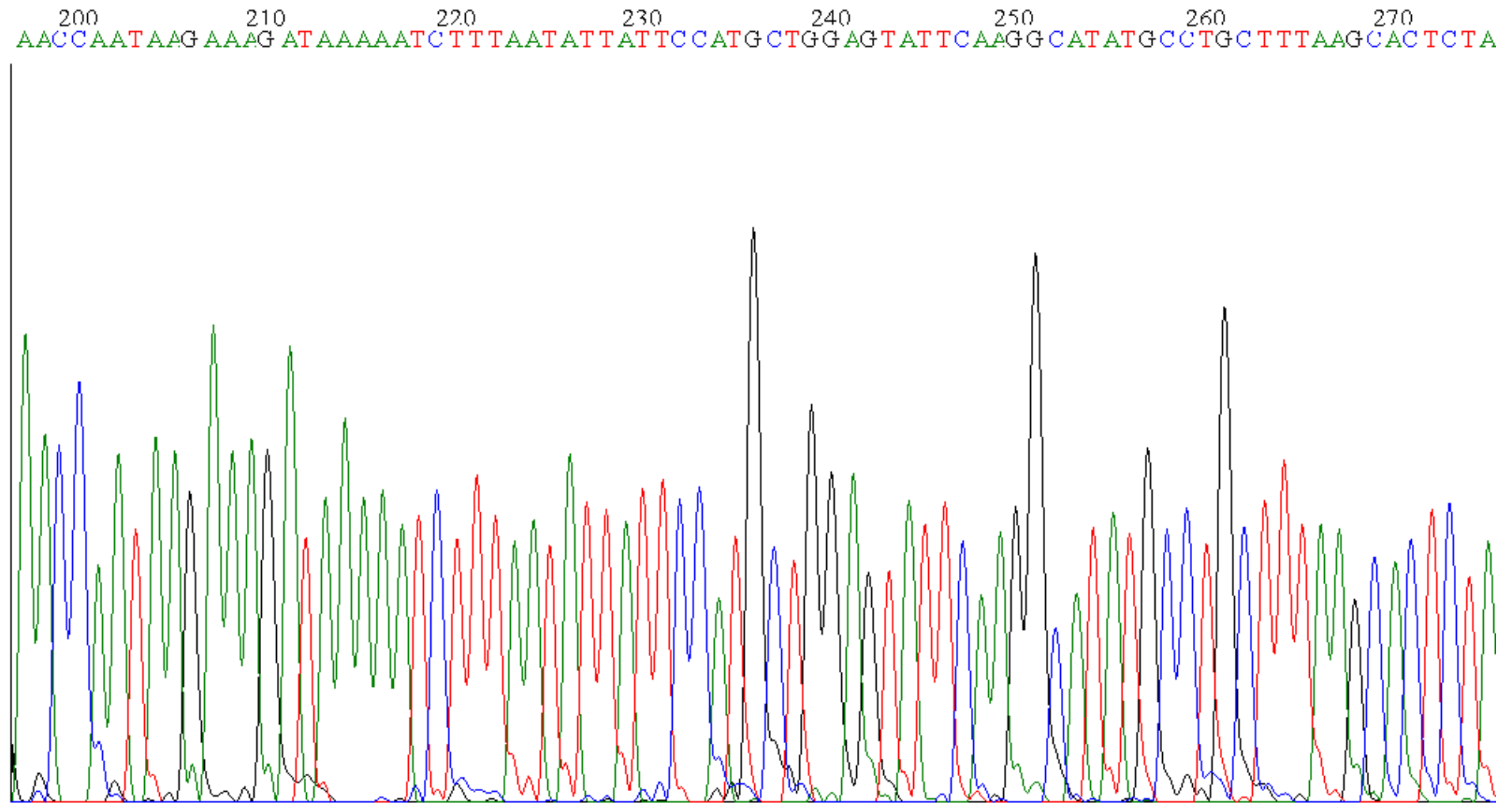


RT- PCR



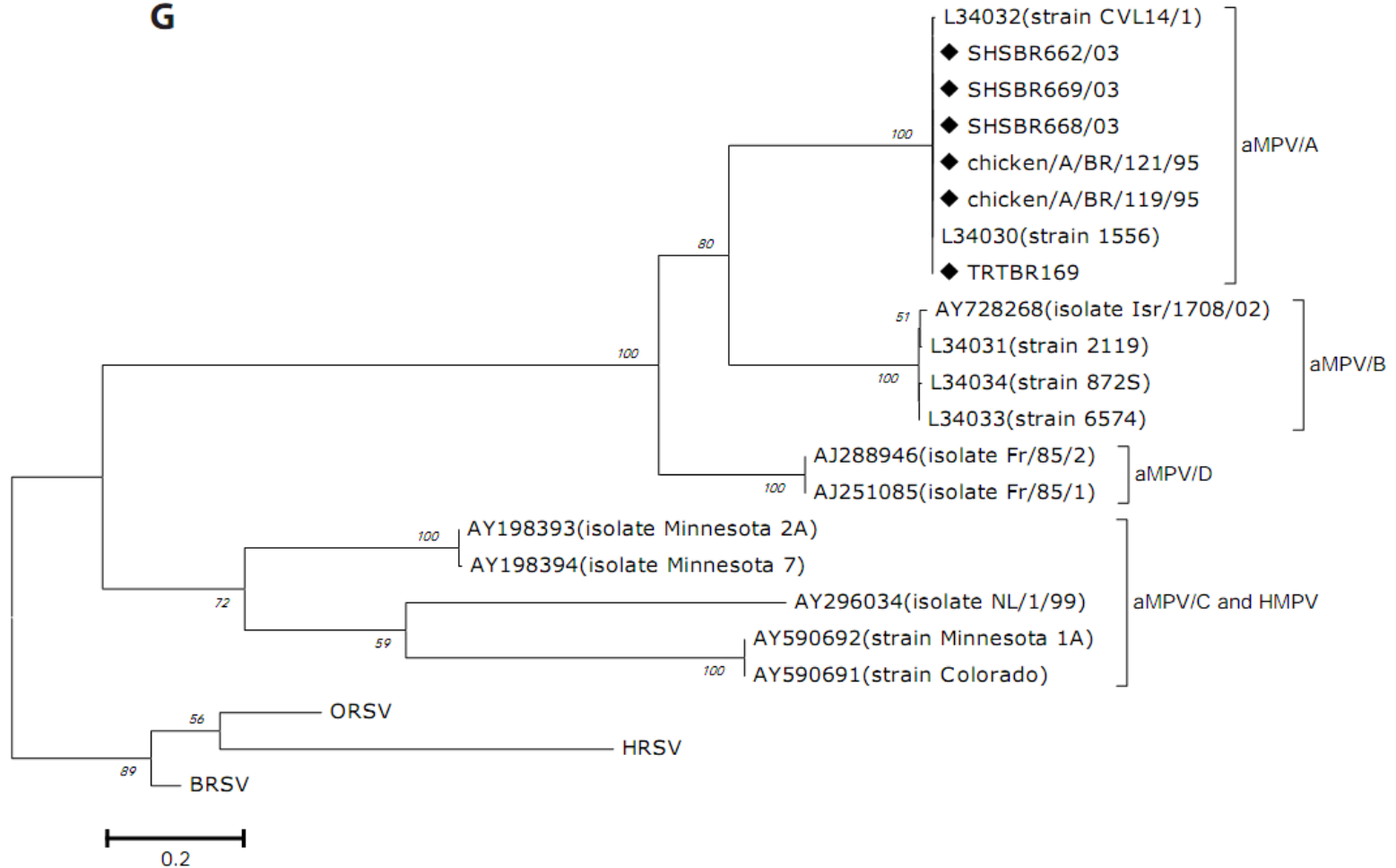
RT-qPCR

SEQUENCIAMENTO



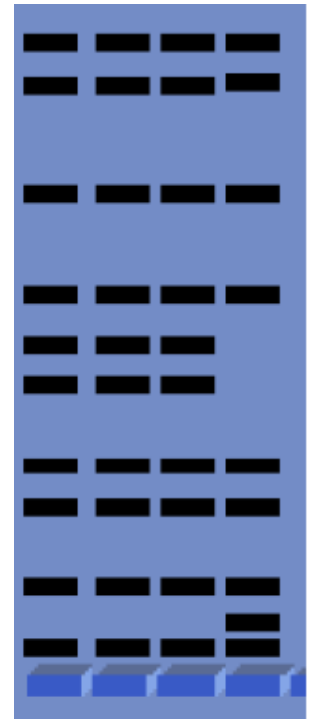
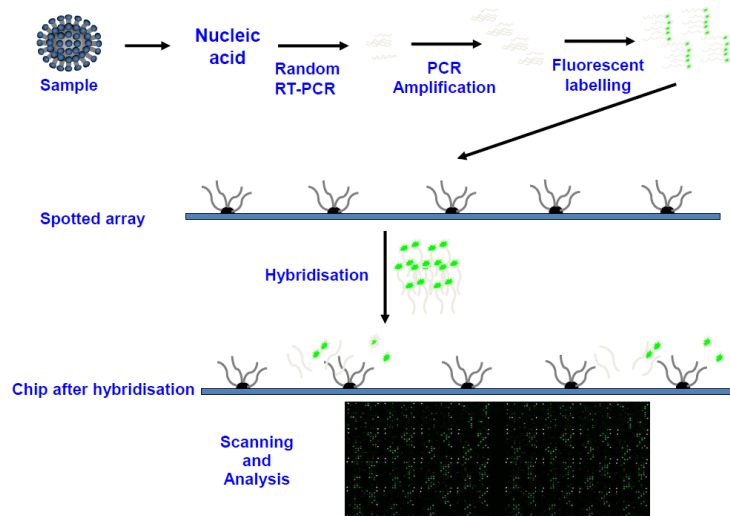
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

G

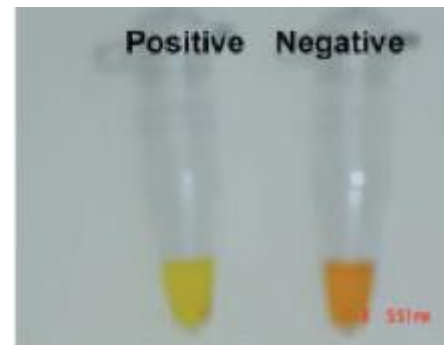


Outras técnicas moleculares

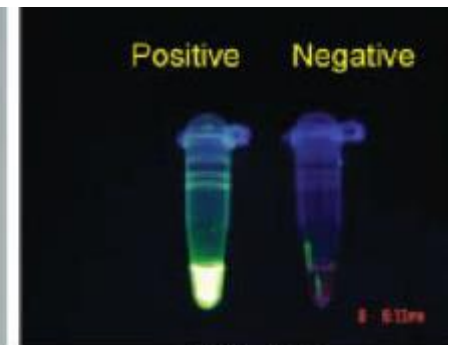
- DNA fingerprint
- LAMP
- Microarray



A B C D I



Normal Light

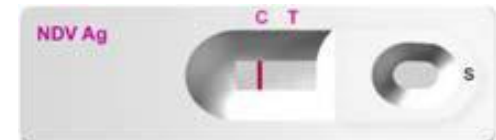


UV Lamp

TESTES RÁPIDOS DE DETECÇÃO



Positivo



Negativo

<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=antigen-detection>

Diagnóstico



SOROLOGIA

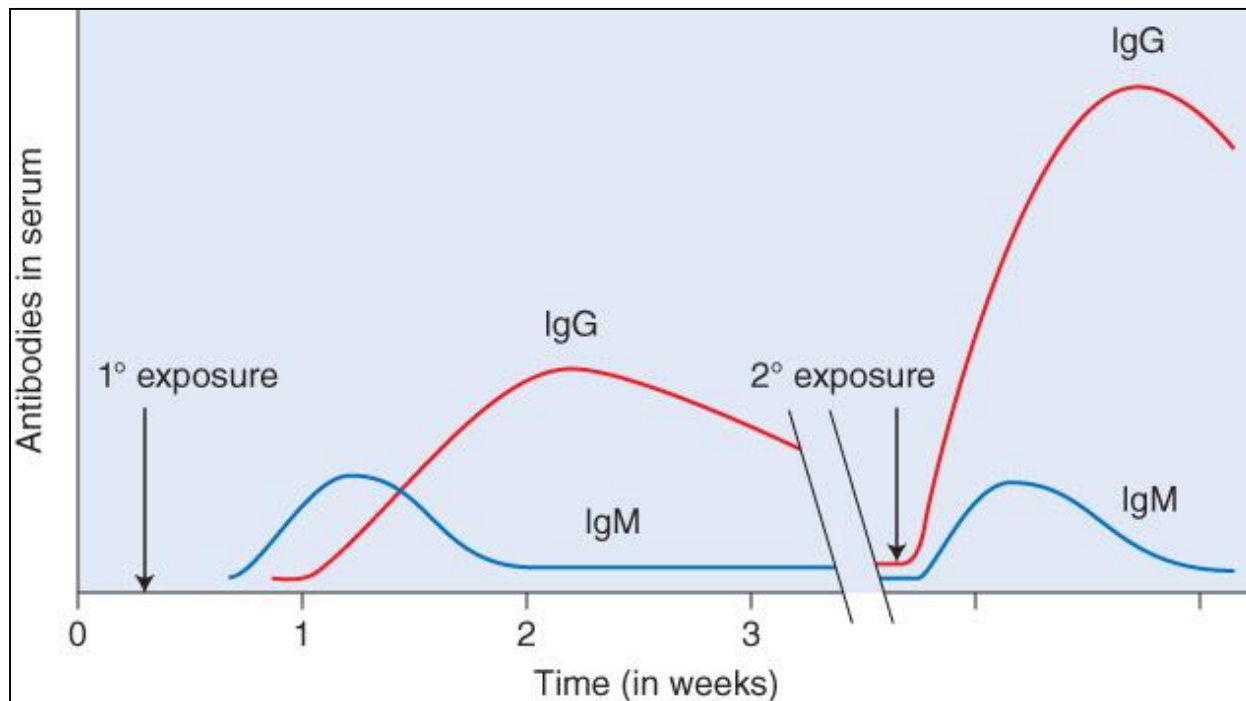
Detecção do aumento do nível de anticorpos entre a fase aguda e convalescente da infecção.

Ou detecção de IgM na infecção primária.

- 1- Testes de neutralização
- 2- Técnicas de IF ou IPX
- 3- Imunoprecipitação em Ágar Gel
- 4- Inibição da hemaglutinação
- 5- ELISA
- 6- Western Blot

SOROLOGIA

- Diagnóstico sorológico:
- Por que amostras de soro “pareadas” ?



SOROLOGIA

INFECÇÃO PRIMÁRIA

- Aumento 4 x ou mais do título de anticorpos IgY entre fase aguda e convalescente
- Presença de IgM
- Soroconversão
- Altos títulos de anticorpos totais – não confiável

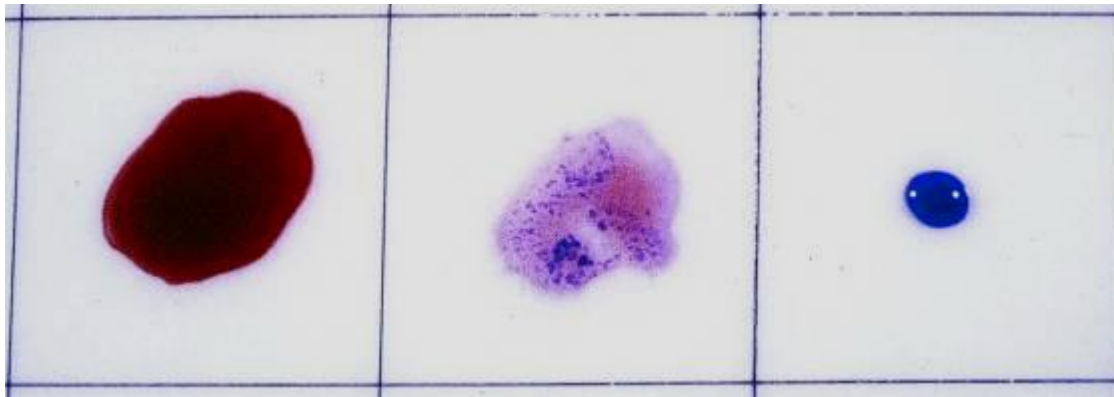
REINFECÇÃO

- Aumento do título de anticorpos IgY entre fase aguda e convalescente
- Ausência ou pequeno aumento de IgM

SOROLOGIA



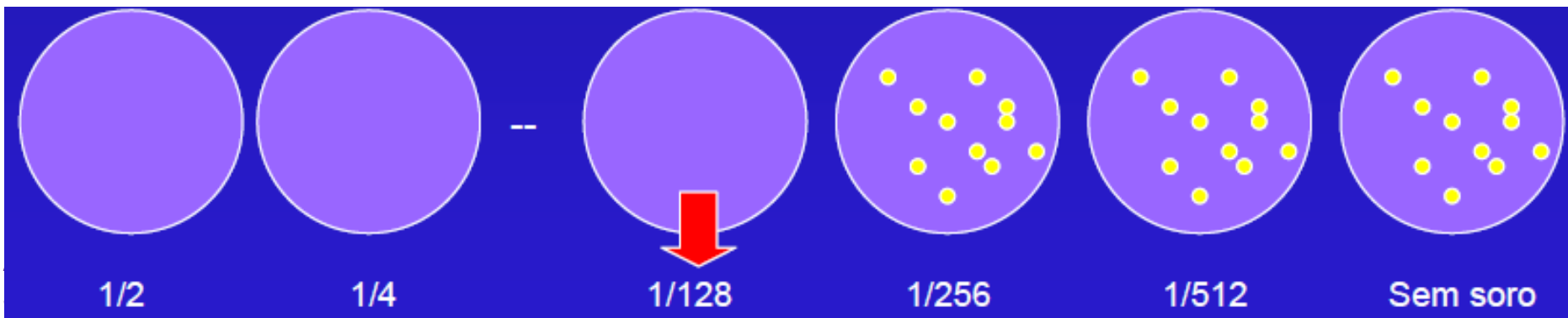
TESTES SOROLÓGICOS



Hemaglutinação com sangue total

SORONEUTRALIZAÇÃO

- **Diluir o soro**
- Adicionar volume igual de vírus (100 DICC50)
- Incubar a 37°C
- Colocar mistura sobre células
- Última diluição SEM multiplicação viral é o título



IMUNODIFUSÃO EM AGAR GEL

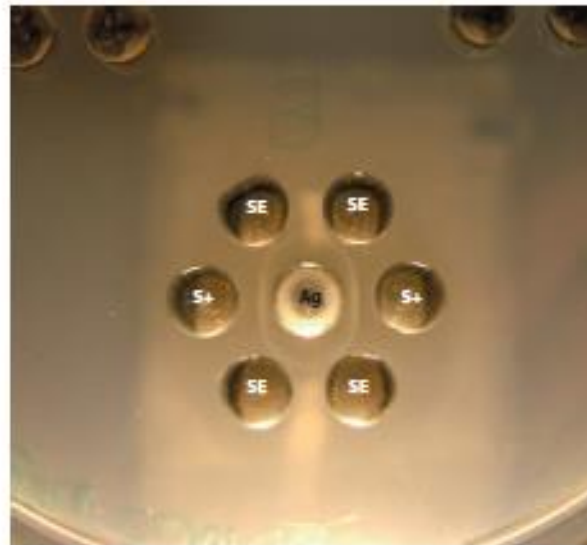
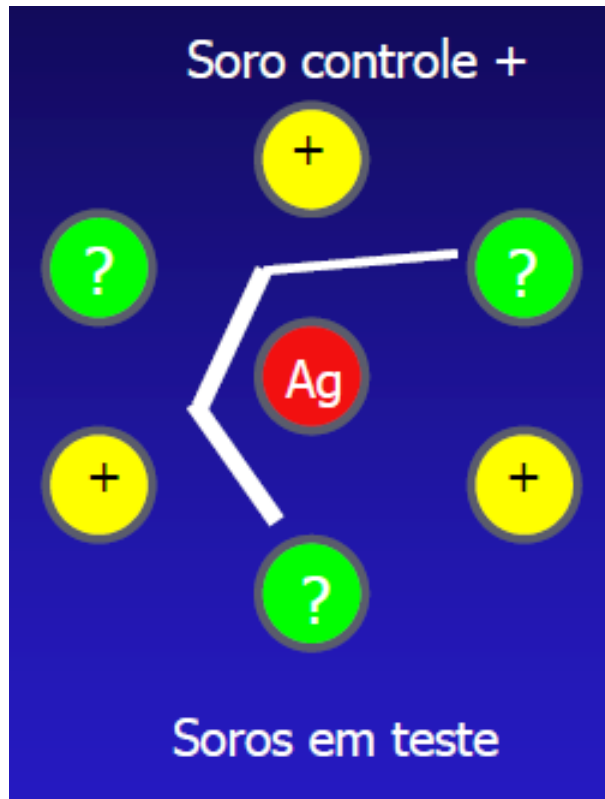


Fig. 7.8 Agar gel precipitation assay. Ag Reference antigen, S+ positive serum, SE serum under examination

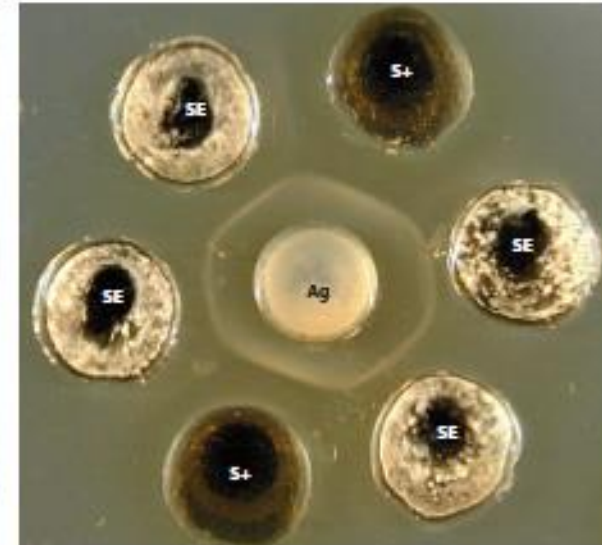
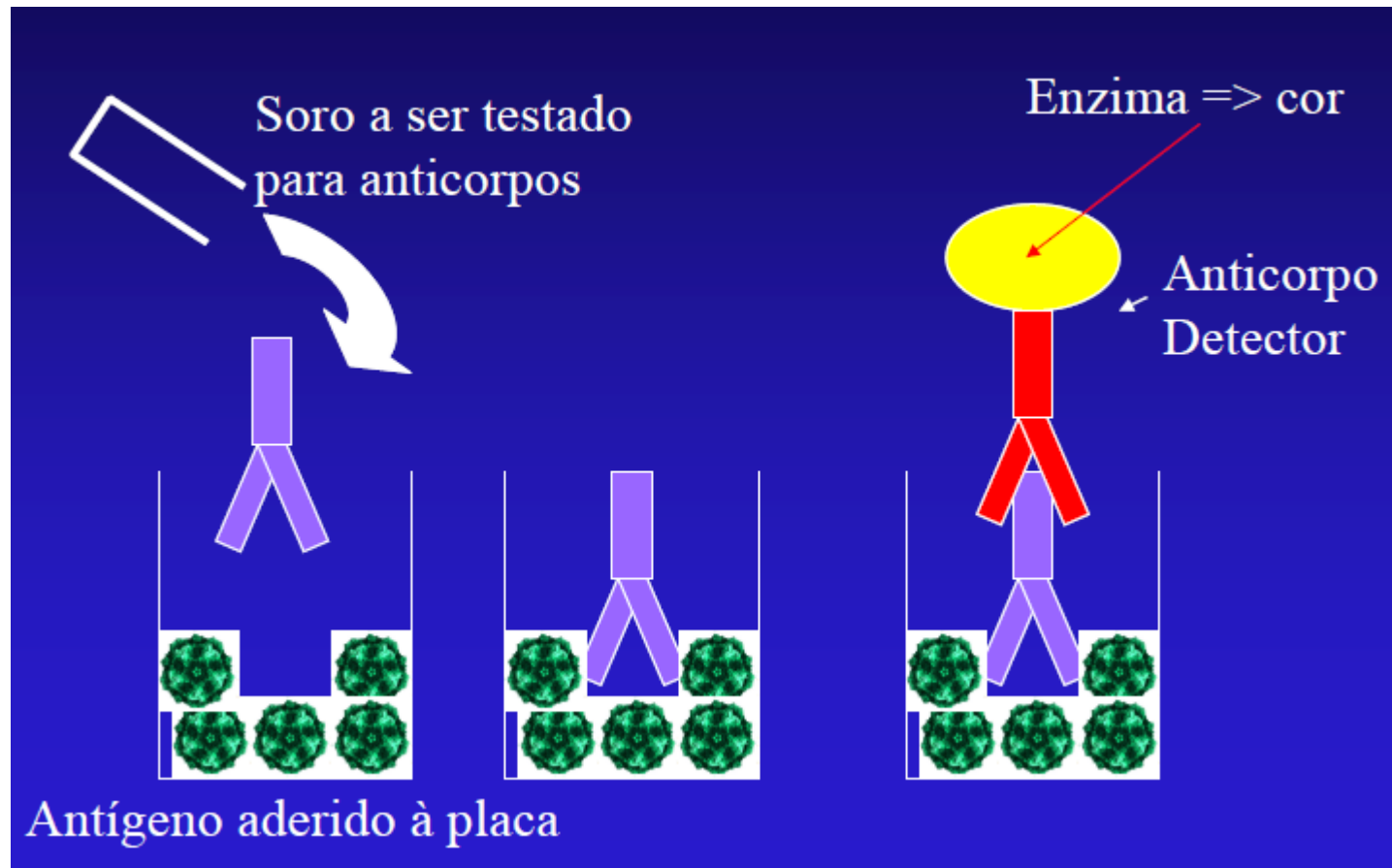
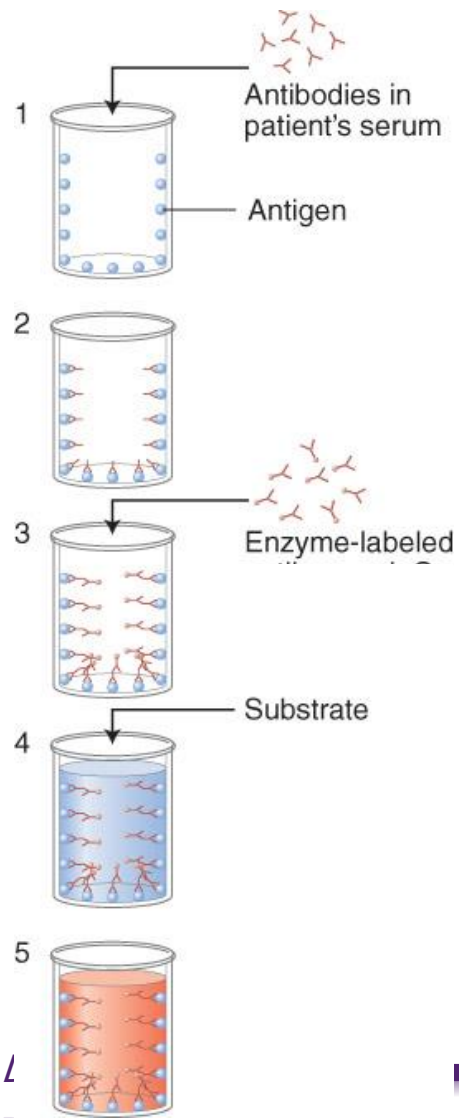
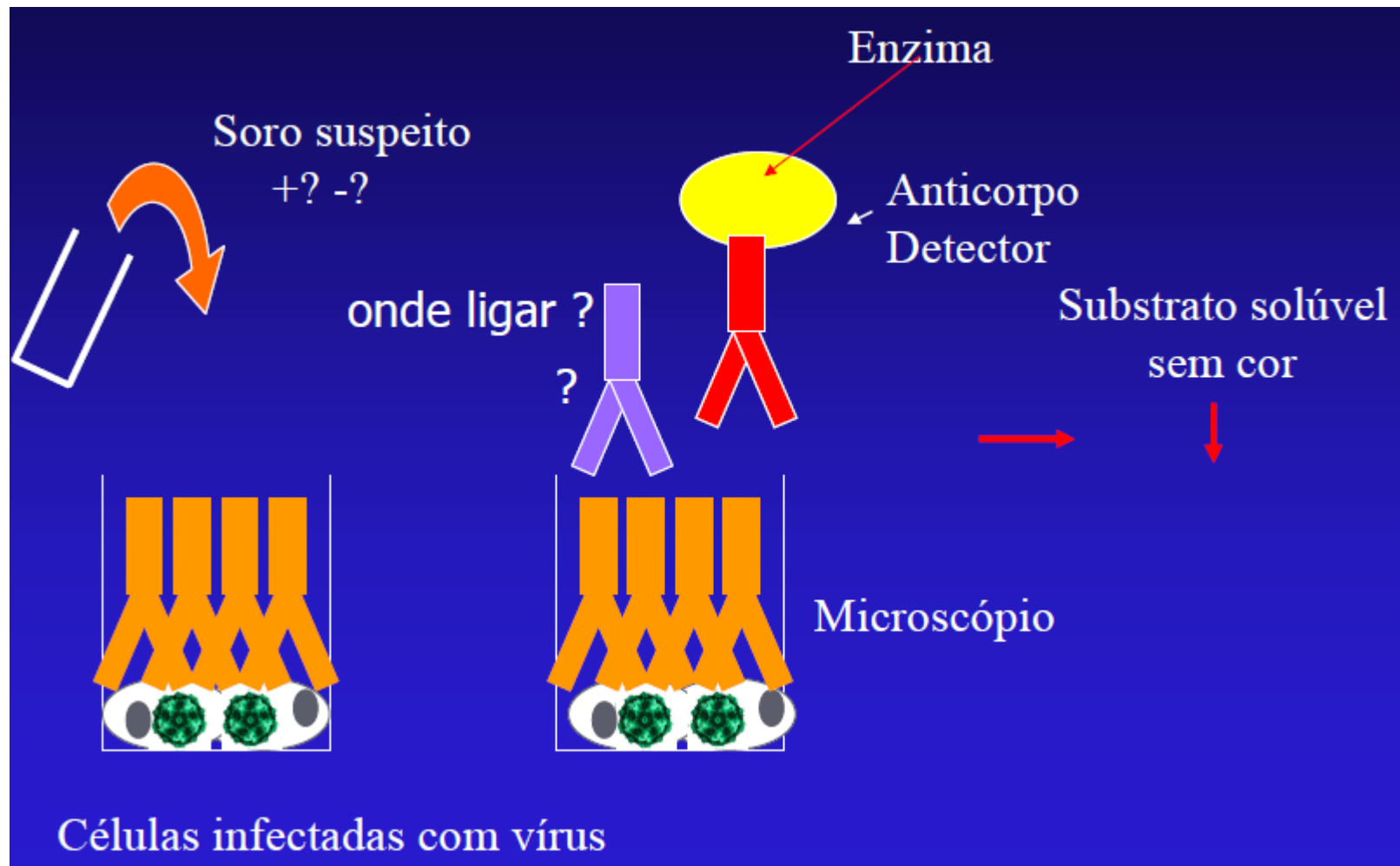


Fig. 7.9 Agar gel precipitation assay: Ag Antigen, S+ positive serum, SE serum under examination

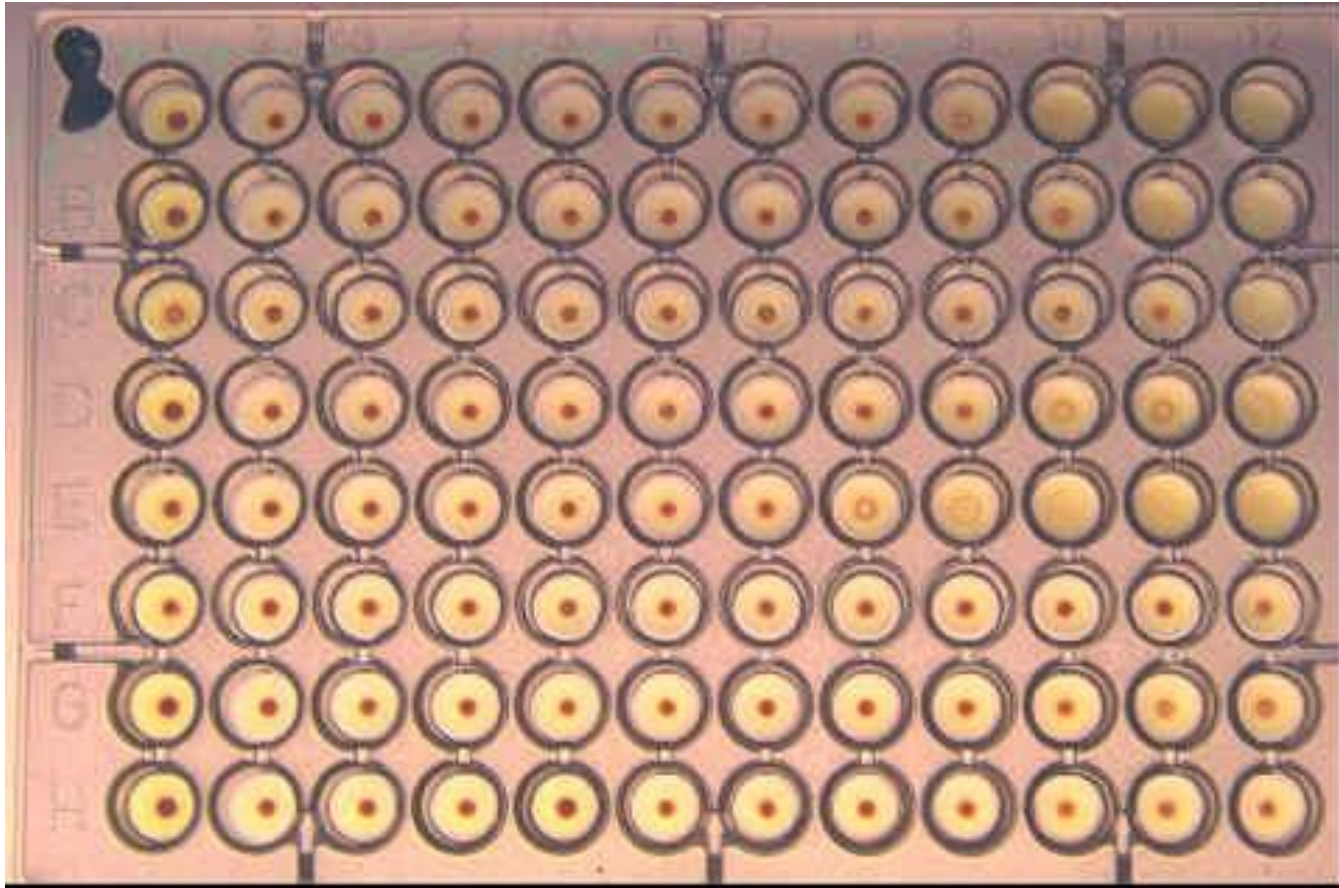
ELISA (INDIRETO)



ELISA (BLOQUEIO)

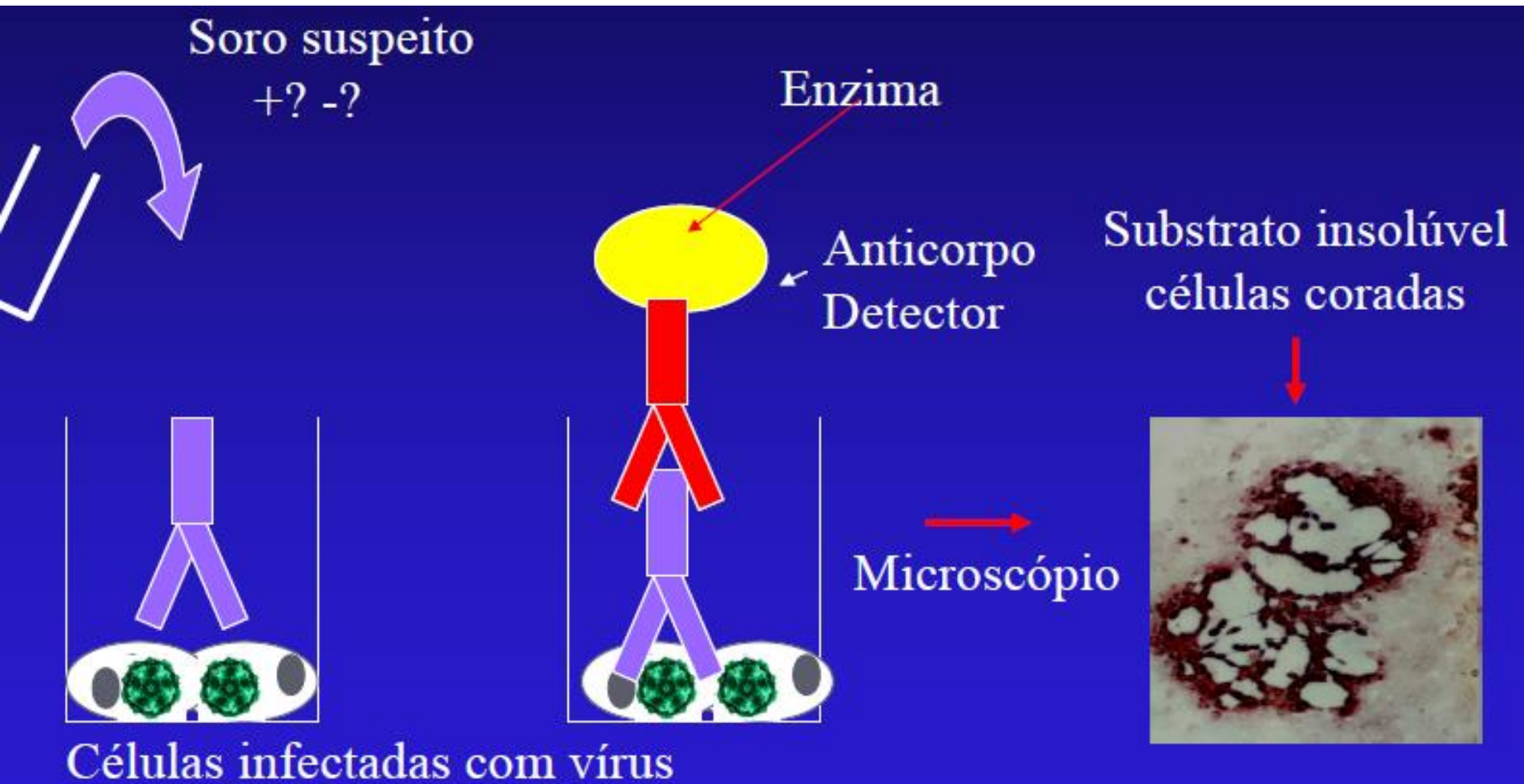


INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO



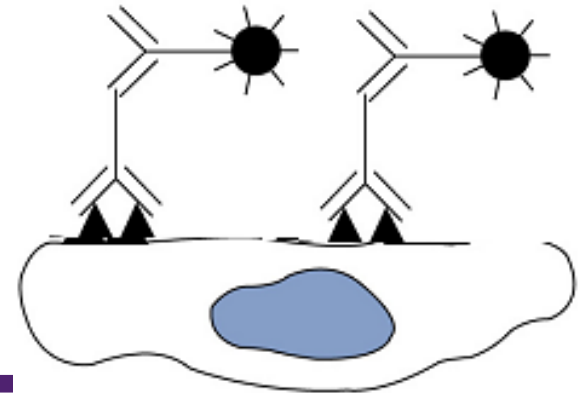
<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=hi-test>

IMUNOHISTOQUÍMICA



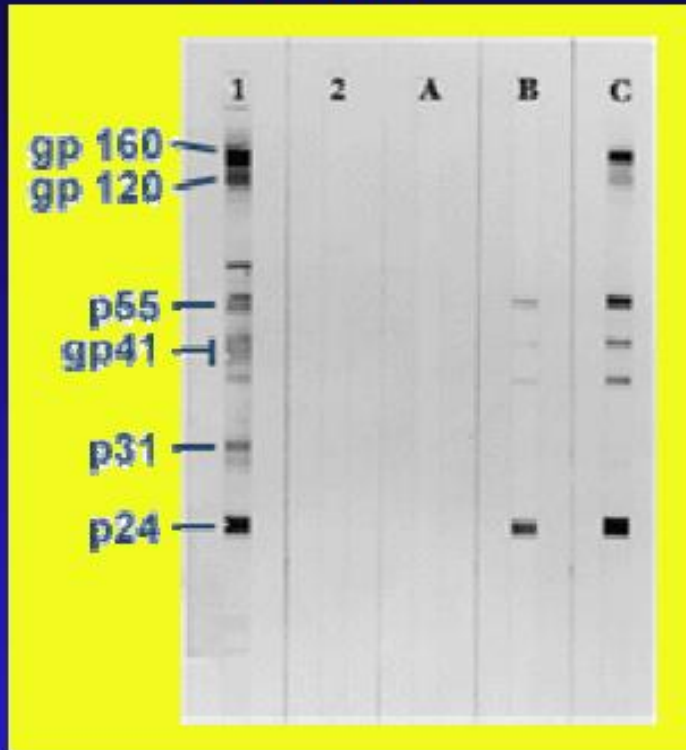
IMUNOFLUORESCÊNCIA

- Indireta para a detecção de anticorpos:
- Material infectado conhecido (células ou tecidos)
- + soro suspeito (ex: soro galinha)
- + conjugado anti-IgG específico (ex. anti-IgY galinha
- conjugado à fluoresceína)
- + luz UV



WESTERN BLOT

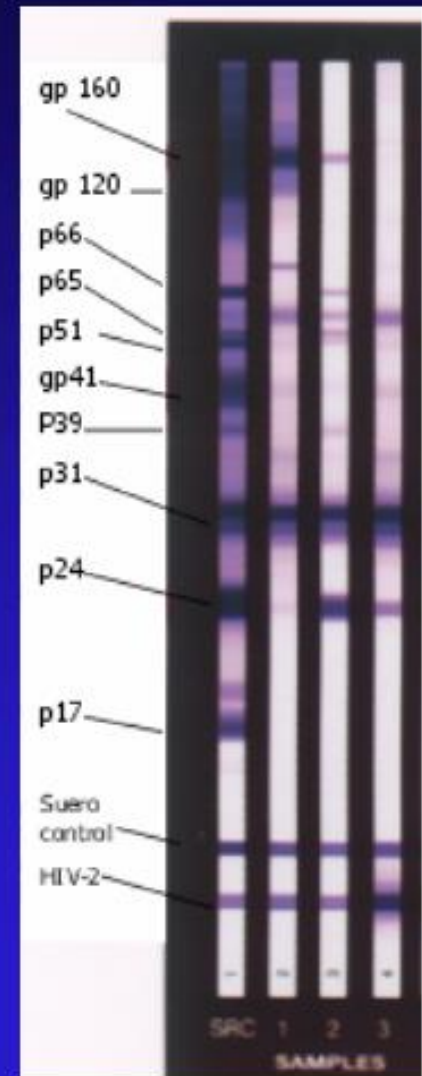
Western Blot



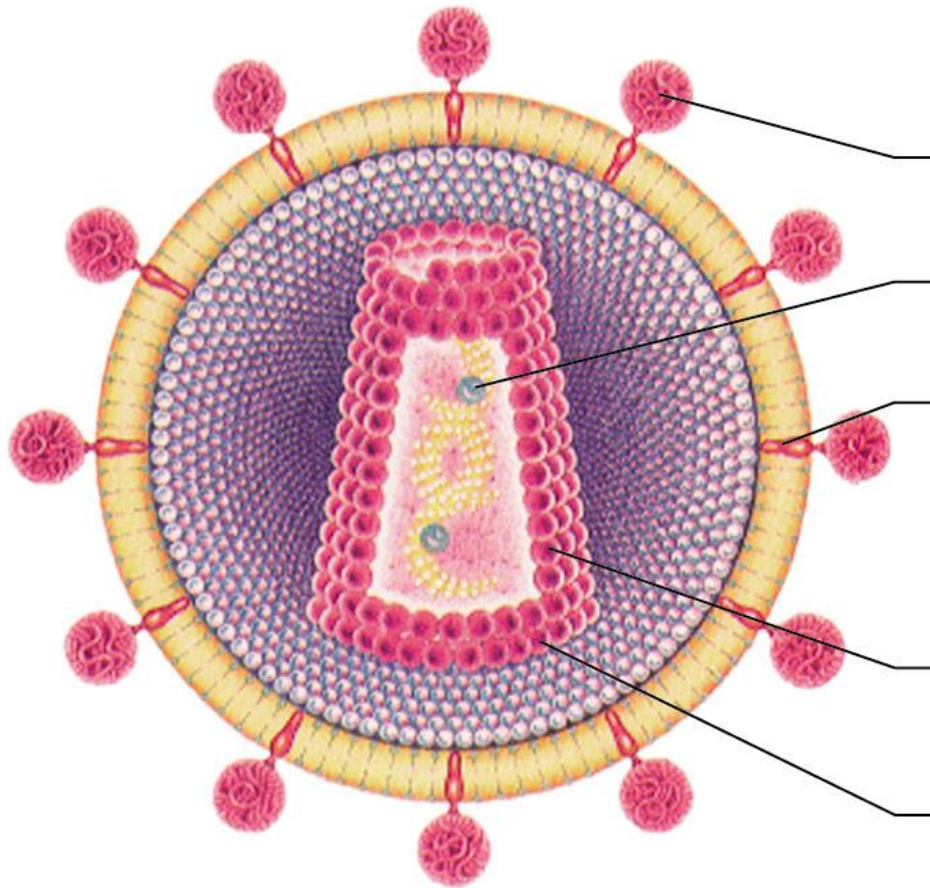
Crêterios:

WB Positivo: p24, gp41, gp120/160
(pelo menos 2 bandas)

WB Negativo: Ausencia total de bandas



WESTERN BLOT



HIV-1



- gp160 (env precursor)
- gp120 (outer env or "surface" glycoprotein)
- p65 (reverse transcriptase)
- p55 (core precursor)/p51 (RT)
- gp41 (transmembrane glycoprotein)
- p40 (core)
- p31 (endonuclease)
- p24 (core shell or "capsid")
- p18 (core matrix)

(c)

SOROLOGIA- LIMITAÇÕES

- Detecta exposição, mas não quando ela ocorreu !!!
- ► Para correlação com a doença:
 - Soros pareados