


DEPARTAMENTO DE  
**MICroBiologia**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



**ICBUSP**

# HERPESVÍRUS

Prof. Jansen de Araujo

Disciplina 0420136 – Integrado de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP)

ICB-II/USP

## HERPESVÍRUS

- São uma das principais causas de doenças humanas associadas a vírus.
- Quando a infecção acontece é para a vida toda do indivíduo.

**O termo *Herpes* vem do grego e significa latente, crônico.**

## FAMILIA HERPESVIRIDAE

- Isolado a primeira vez em 1960- Possui mais de 130 representantes;
- Co-evoluem com seu hospedeiro a mais de 200 milhões de anos;
- Síntese e a montagem do capsídeo ocorrem no núcleo da célula;
- O envelope no trânsito pela membrana;
- A produção de partículas resulta na destruição da célula hospedeira;
- Possui capacidade de **latência** assumindo uma forma circular!

## HERPESVÍRUS

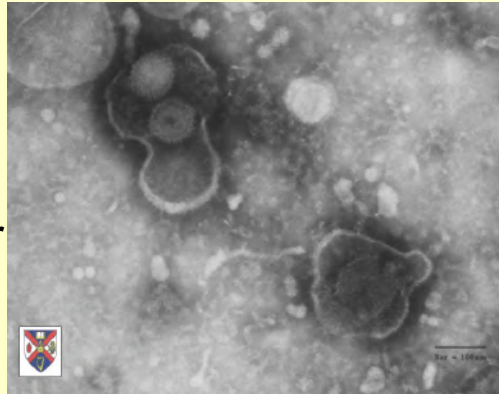


Order: Herpesvirales	(3 Families)	history	
Family: Alloherpesviridae	(4 Genera)	history	
Family: Herpesviridae	(3 Subfamilies)	history	→ Peixes e anfíbios
Subfamily: Alphaherpesvirinae	(5 Genera)	history	
Genus: <i>Illousvirus</i>	(2 Species)	history	
Genus: <i>Mardivirus</i>	(2 Species)	history	
Genus: <i>Scutavirus</i>	(1 Species)	history	
Genus: <i>Simplexvirus</i>	(11 Species)	history	
Genus: <i>Unassigned</i>	(1 Species)	history	
Genus: <i>Varicellovirus</i>	(17 Species)	history	
Subfamily: Betaherpesvirinae	(4 Genera)	history	
Genus: <i>Cytomegalovirus</i>	(8 Species)	history	
Genus: <i>Murinegavirus</i>	(3 Species)	history	
Genus: <i>Proboscivirus</i>	(1 Species)	history	
Genus: <i>Roseolavirus</i>	(3 Species)	history	
Genus: <i>Unassigned</i>	(3 Species)	history	
Subfamily: Gammaherpesvirinae	(4 Genera)	history	
Genus: <i>Lymphocryptovirus</i>	(8 Species)	history	
Genus: <i>Macavirus</i>	(9 Species)	history	
Genus: <i>Peicavirus</i>	(3 Species)	history	
Genus: <i>Rhadinovirus</i>	(9 Species)	history	
Genus: <i>Unassigned</i>	(3 Species)	history	
Genus: <i>Unassigned</i>	(1 Species)	history	
Family: Malacoherpesviridae	(2 Genera)	history	→ Bivalves

Mamíferos, aves e répteis

## Herpesvirus

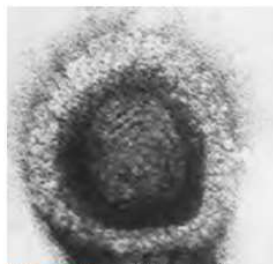
Infectam  
células vizinhas sem  
passar  
pelo meio extracelular



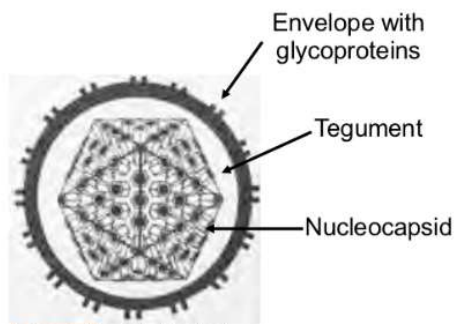
www.microbiologybytes.com

## Herpes viruses

- Family: *Herpesviridae*
- Large, enveloped virus
- Double-stranded DNA genome (100-150 proteins)



PG-INEL Source Undetermined



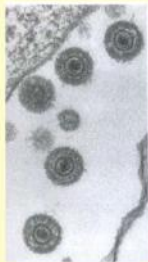
PG-INEL Source Undetermined

## HERPESVÍRUS

- Vírus envelopados, com capsídeo icosaédrico.
- Partícula de diâmetro entre 100-200nm.
- Genomas de DNA dupla fita, linear, grandes (até 235kbp)
- São vírus complexos (vírions com ~35 proteínas diferentes)
- Codificam uma variedade de enzimas envolvidas no metabolismo e síntese de DNA e no processamento de proteínas.
- Os tipos diferem na sequência do seu genoma e suas proteínas, mas são semelhantes em termos de estrutura do vírion e organização genômica.
- **Replicação: Nuclear.**
- **Montagem: Nuclear.**

### Estrutura dos herpesvírus humanos

**Nucleocapsídeo icosaédrico, com 100-110 nm de diâmetro com 162 capsômeros.**



**Existe um material amorfo em torno do capsídeo, abaixo do envelope, chamado tegumento.**

**O envelope contém glicoproteínas que formam espículas.**

**Os vírions (partículas completas) têm de 120 a 300 nm de diâmetro, e contêm de 30 a 35 polipeptídeos diferentes.**

## HSV DOENÇA CLÍNICA

**Lesões cutâneas (oral);**

**Lesões genitais;**

**Pode ser assintomático com reativações.**



### **Patogênese**

**Células epiteliais são lisadas e espalham nas células adjacentes**

### **Complicações**

**Doença ocular**

**Envolve problemas no SNC (encefalites)**

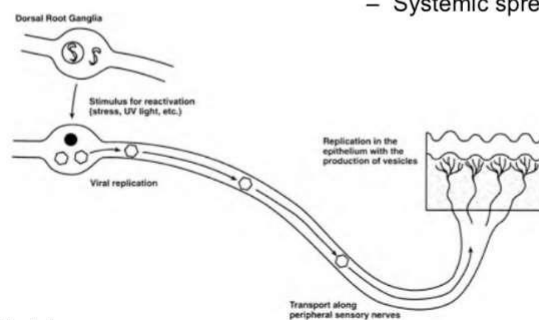
## HSV latency

### • **Establishment**

- Retrograde transmission
- Sensory ganglia nerve cells

### • **Reactivation**

- Anterograde transmission
- UV light, stress, infection, menstruation
- Systemic spread rare



## HERPESVÍRUS

### Patogénicos em humanos

#### Alfa

Vírus Herpes simplex (HSV-1/HSV-2, HHV1/2)  
Vírus Varicela zoster (VZV/HHV-3) (Catapora)

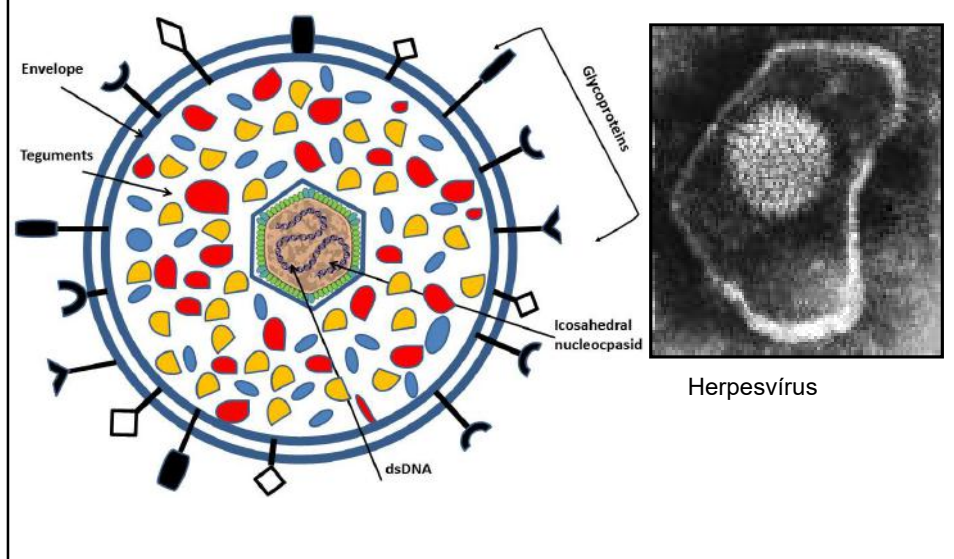
#### Beta

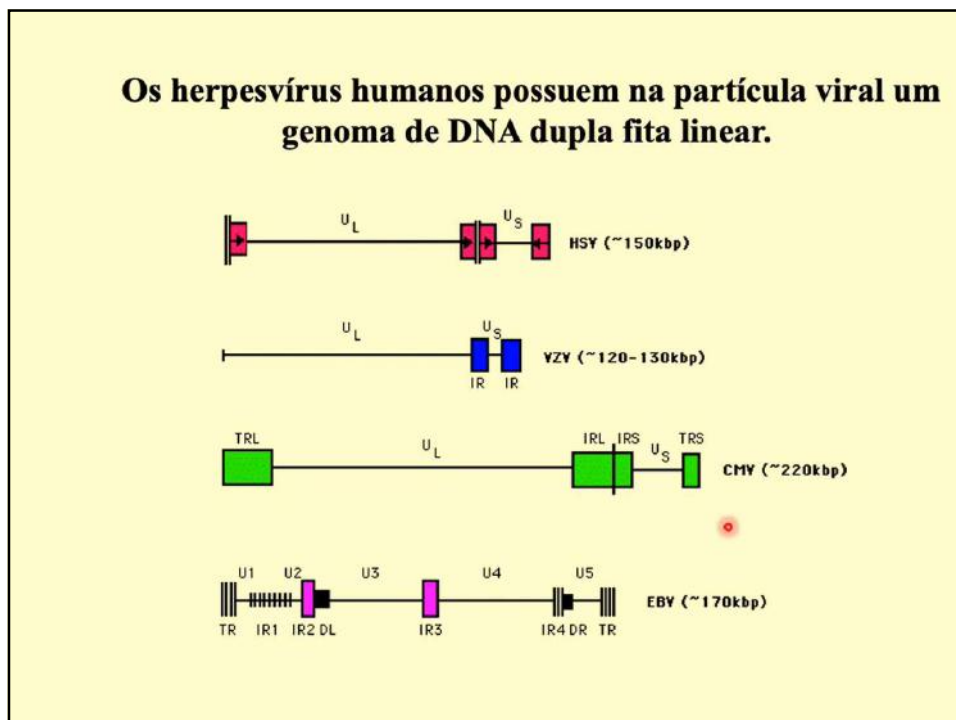
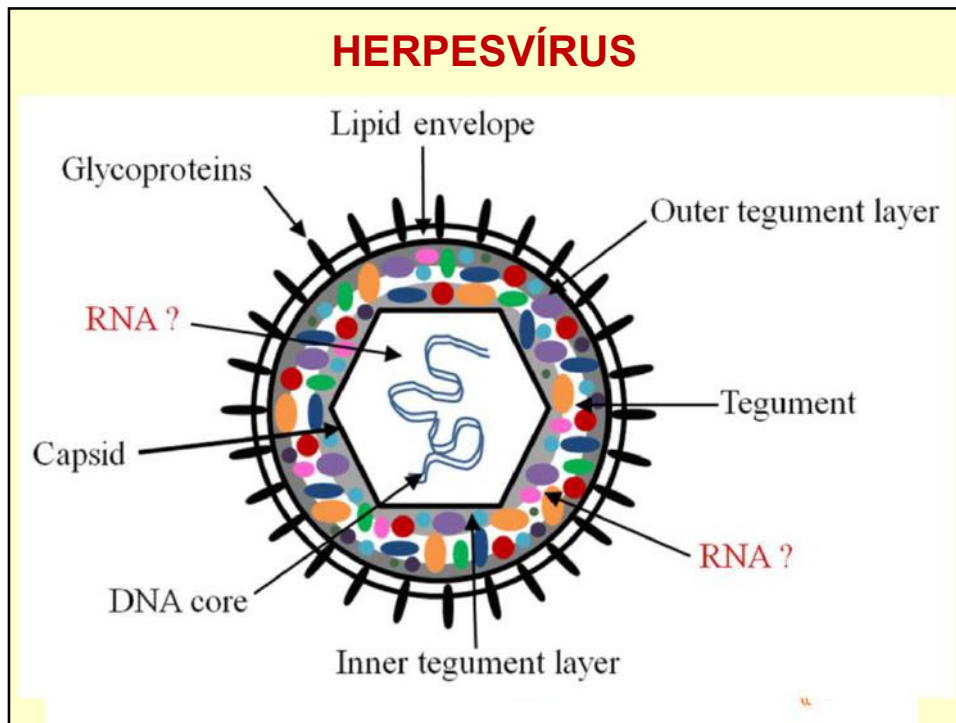
Citomegalovírus humano (HCMV/HHV-5)  
Herpesvírus humano 6, 7 (HHV-6, HHV-7)

#### Gama

Vírus Epstein Barr (EBV/HHV-4) (oncovirus)  
Herpesvírus humano 8 (HHV-8/KSHV)

## HERPESVÍRUS

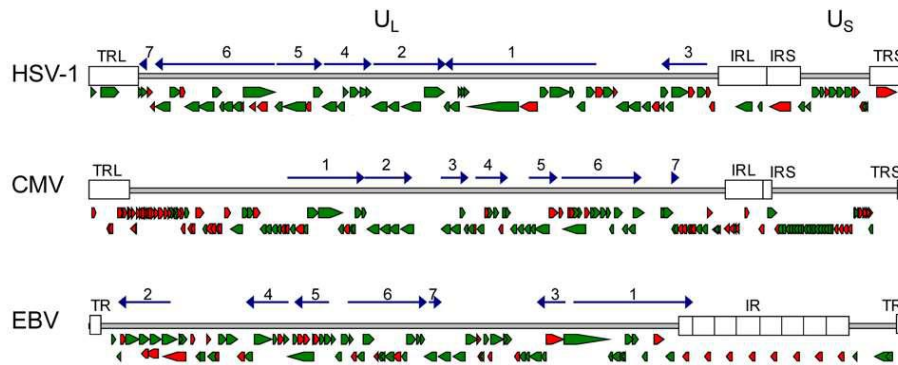




## HERPESVÍRUS

- Organização do genoma

Pergunta de prova!!!!

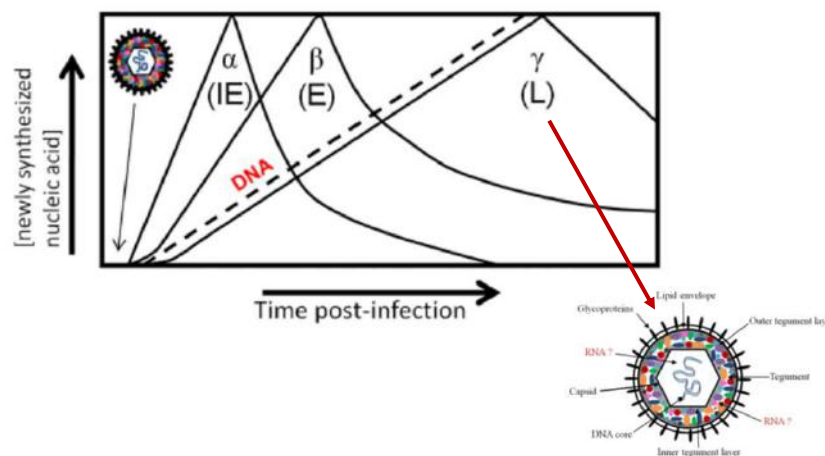


Viruses 2009, 1(3), 420-440; doi:10.3390/v1030420

## HERPESVÍRUS

- Ciclo viral

- Expressão dos genes precoces imediatos, precoces e tardios





## Replicação numa célula epitelial

### Infecção produtiva

Vírus com genoma de DNA de fita dupla,  
replicação dos herpesvírus ocorre no núcleo.

Dividida nas etapas:

Precoce (*immediate early*, expressão dos genes alfa)

Intermediária (*early*, genes beta)

Tardia (*late*, genes gama)

Rede regulatória:

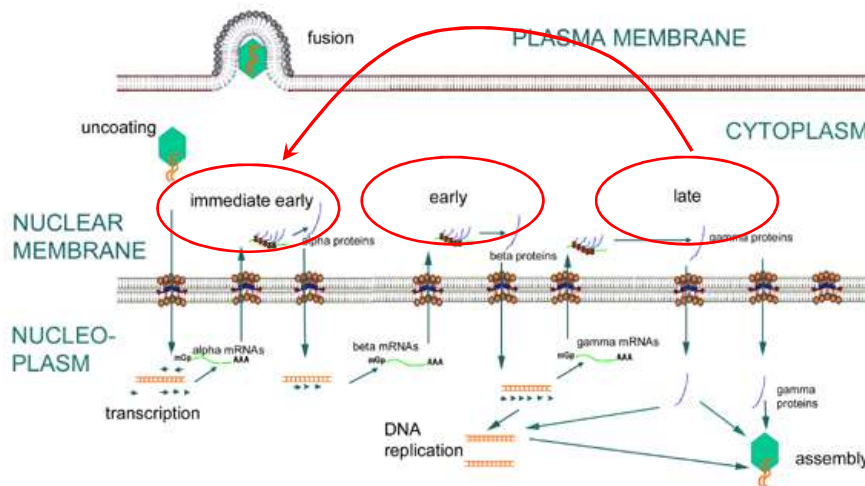
Genes alfa estimulam a transcrição dos beta,  
que reprimem os alfa e estimulam os gama,  
que reprimem alfa e beta.

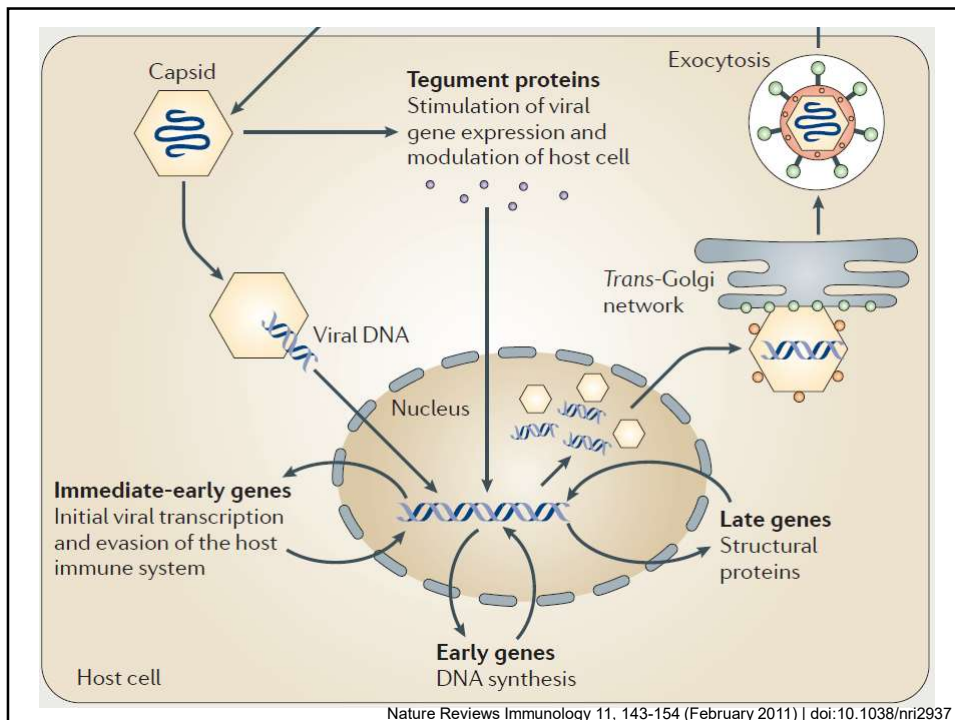
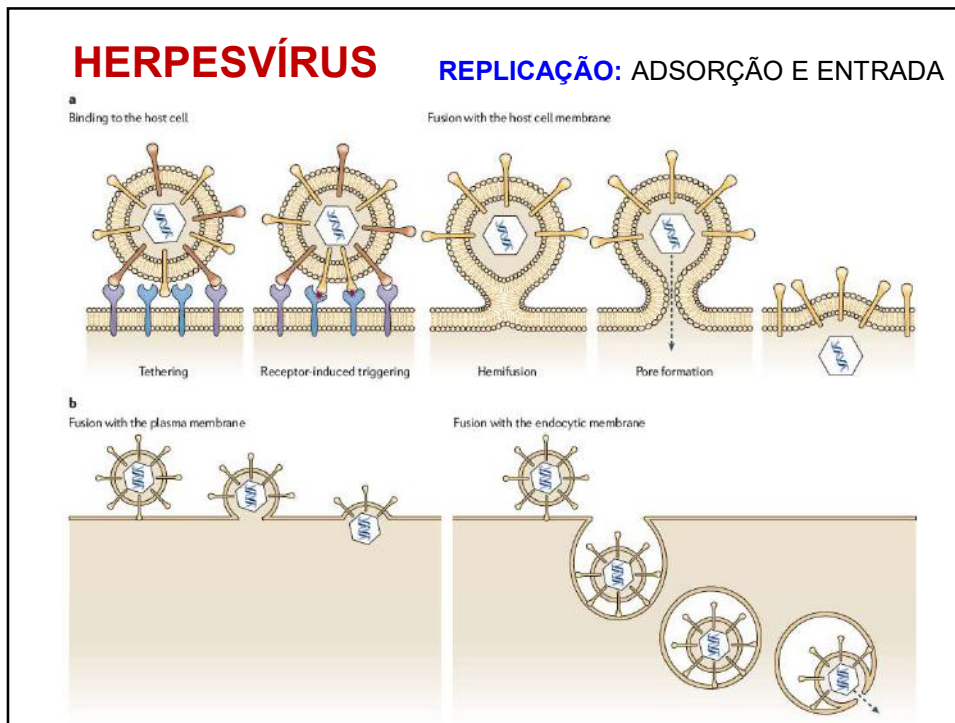
Expressão sequencial e coordenada dos  
genes virais.

## HERPESVÍRUS

### ▪ Ciclo viral

- Expressão dos genes precoces imediatos, precoces e tardios





### Interferência no metabolismo

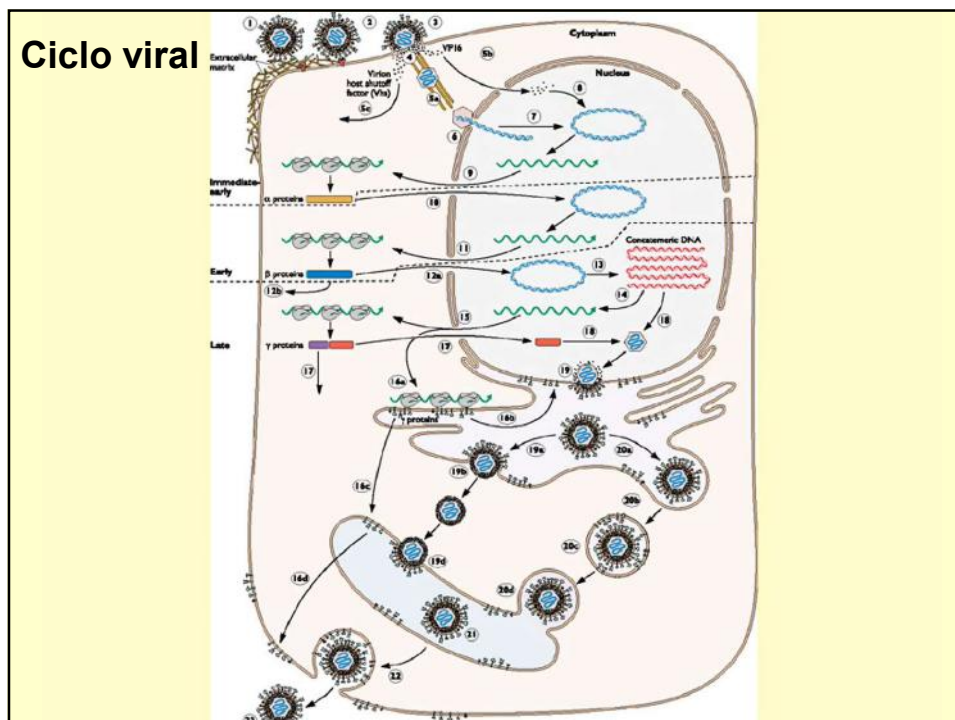
Uma proteína importante do tegumento é a VHS (*virus host shutoff*), que inibe a síntese proteica celular.

### Transporte do capsídeo.

O capsídeo é transportado através de micro túbulos até a proximidade de poros nucleares, sendo o genoma viral injetado no núcleo.

### Ativação da expressão gênica viral

Outra proteína importante do tegumento é a VP16, que ativa a transcrição a partir de promotores de genes virais precoces onde há uma sequência de bases por ela reconhecida, dando início à fase precoce.



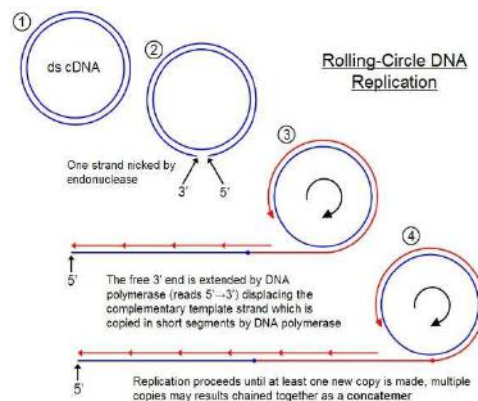
### Transcrição, tradução e atuação dos genes virais $\beta$ (intermediários).

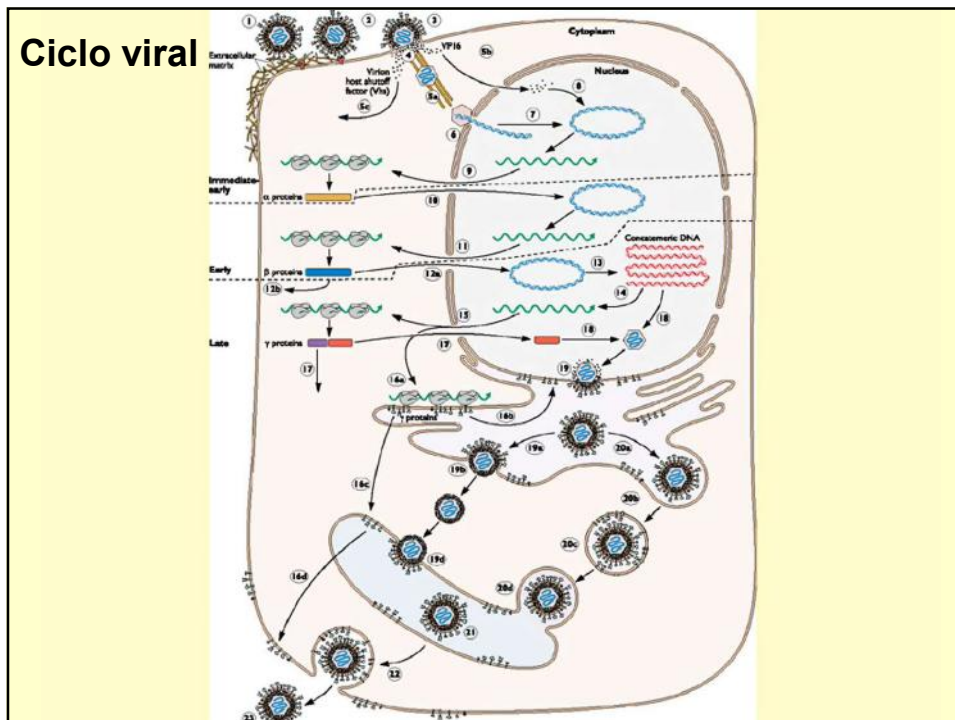
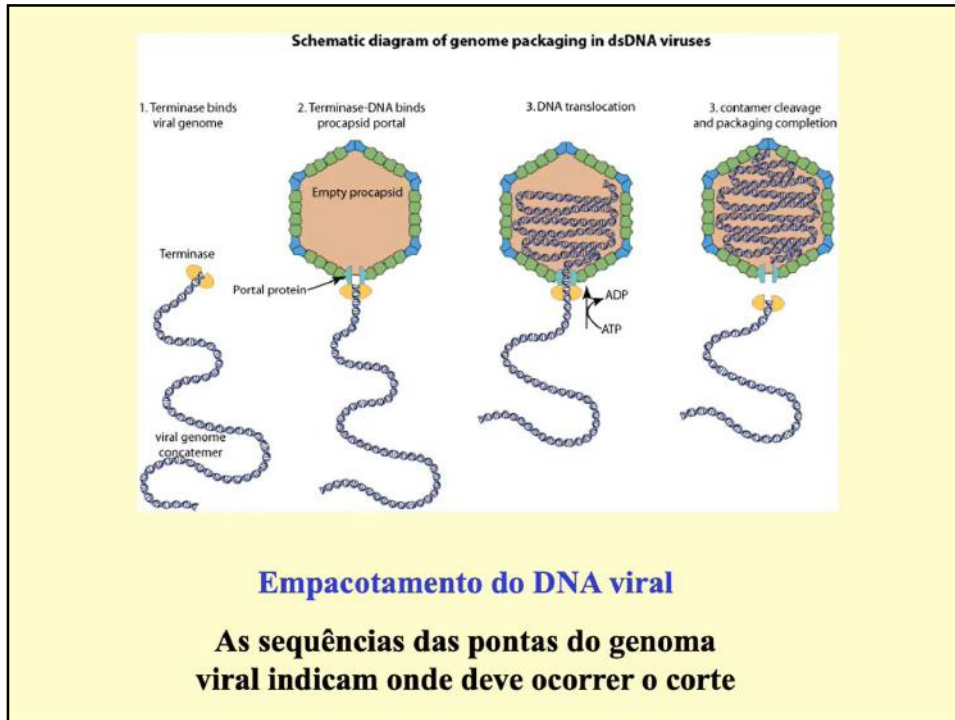
Estes codificam enzimas envolvidas na síntese de DNA viral (mecanismo do “círculo rolante”) e degradação do DNA celular. Ex.: Ribonucleotídeo redutase, timidina quinase e DNA polimerase.

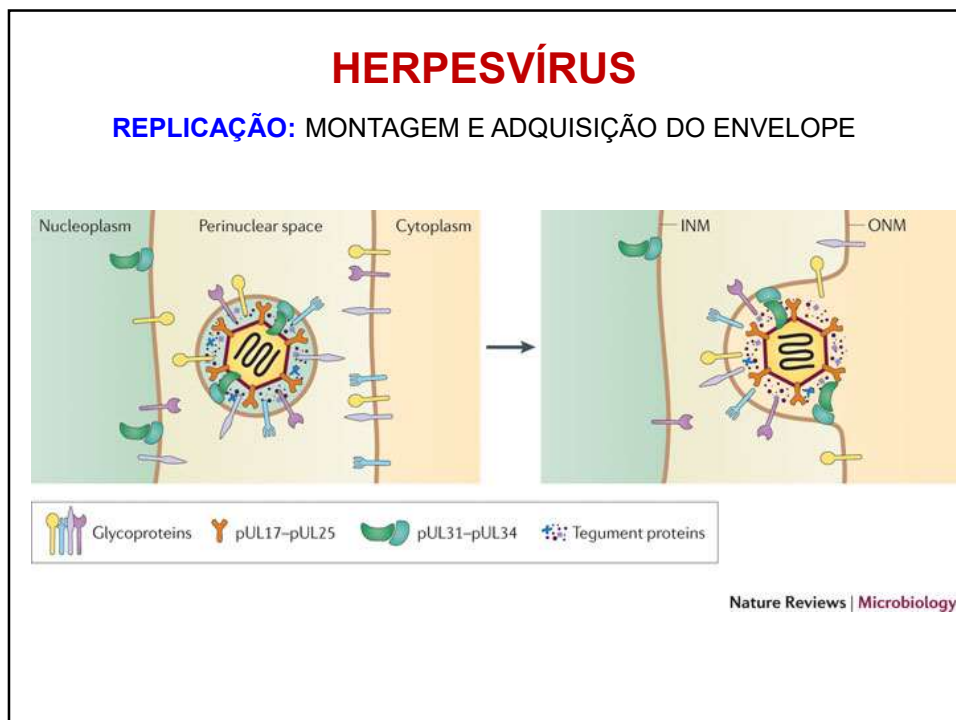
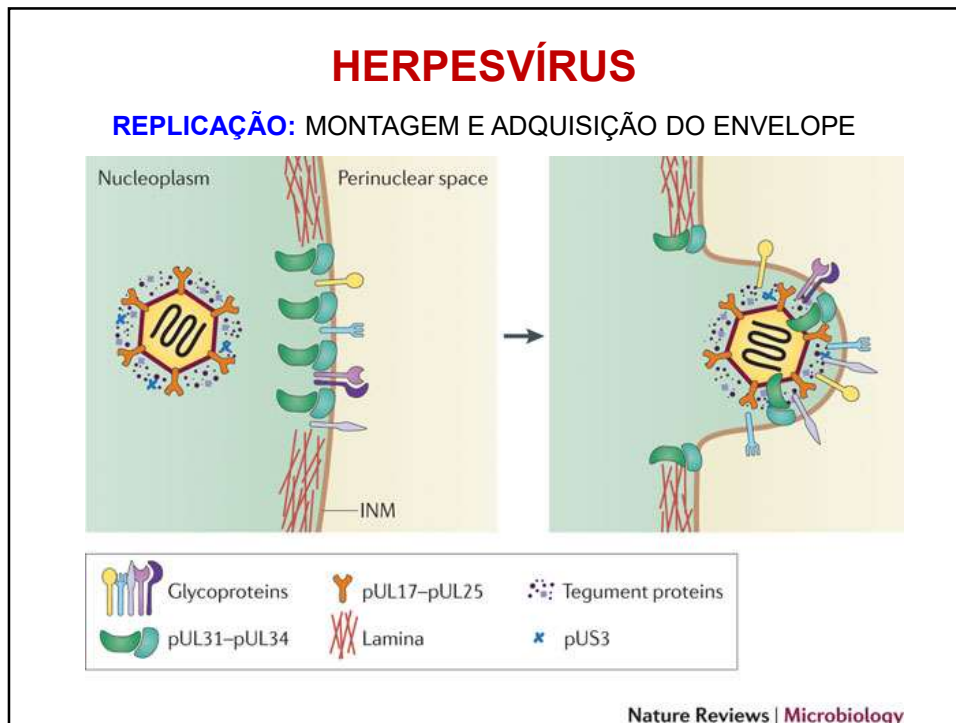
## HERPESVÍRUS

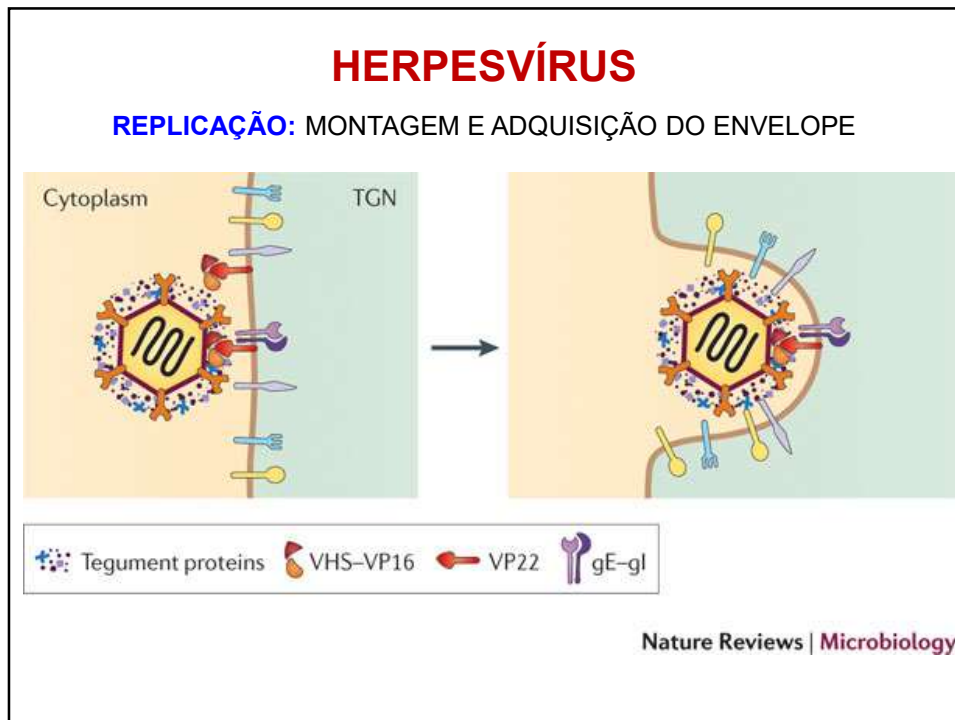
### REPLICAÇÃO DO GENOMA

- A replicação acontece pelo mecanismo de “rolling circle” formando repetições em tandem.
- Finalmente estes repetidos são clivados.





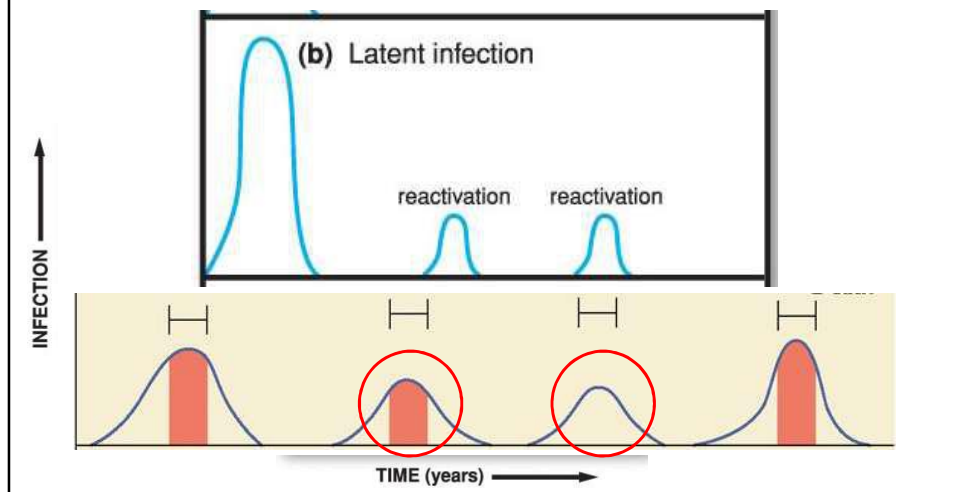




- ## HERPESVÍRUS
- Três subfamílias (Patogénicos em humanos):
    - Alphaherpesviruses (HSV-1/HHV1; HHV2/HSV-2; VZV/HHV-3)
    - Betaherpesviruses (HCMV/HHV-5; HHV-6; HHV-7)
    - Gammaherpesviruses (EBV/HHV-4; HHV-8/KSHV)
  - Estabelecem infecções latentes e persistentes após a infecção primária.
  - A reativação acontece principalmente em períodos de imunossupressão.
  - A infecção primária e a reativação são mais graves em indivíduos imunossuprimidos.

## HERPESVÍRUS INFEÇÃO LATENTE

**Latência** - Estado transcricional e traducional único do vírus. O ciclo produtivo não funciona mas pode ser ativado a qualquer momento.



### Inibidores do DNA polimerase:

- Cidofovir
- Penciclovir
- Foscarnete
- Aciclovir





O aciclovir é um nucleosídeo sintético análogo da purina

## INIBIDORES DA DNA-POLIMERASE

### Aciclovir (Pro-fármaco)

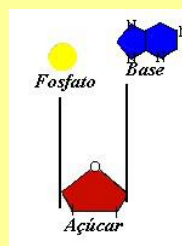
- Primeiro medicamento antiviral seletivo eficaz.
- Possui pouca ação contra o Citomegalovirus
- Pode ser administrado oralmente (imunocompetentes), intravenosamente (imunocomprometidos) ou topicamente

- Herpes Simples:
  - herpes labial;
  - Conjuntivite;
  - úlceras bucais e infecções gengivais.
- Varicela Zoster
- Herpes zoster e catapora.

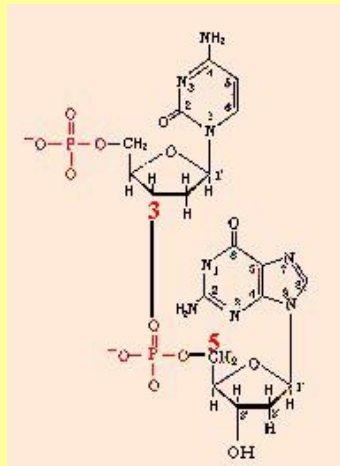


## Nucleotídeos

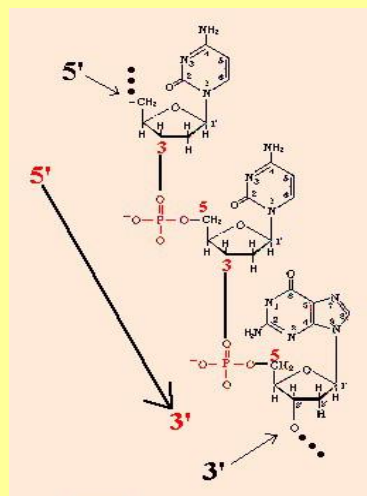
- Os nucleotídeos, unidades básicas dos ácidos nucléicos, são constituídos de
  - Uma **base nitrogenada** (anel heterocíclico de átomos de carbono e nitrogênio)
  - Uma **pentose** (açúcar com cinco carbonos)
  - Um **grupo fosfato** (molécula com um átomo de fósforo cercado por 4 oxigênios)



## Ligação entre os Nucleotídeos (2/4)

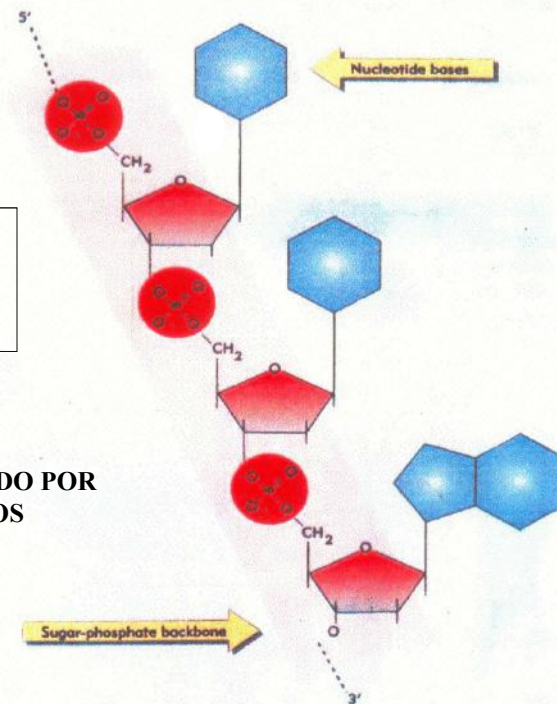


## Ligação entre os Nucleotídeos (4/4)

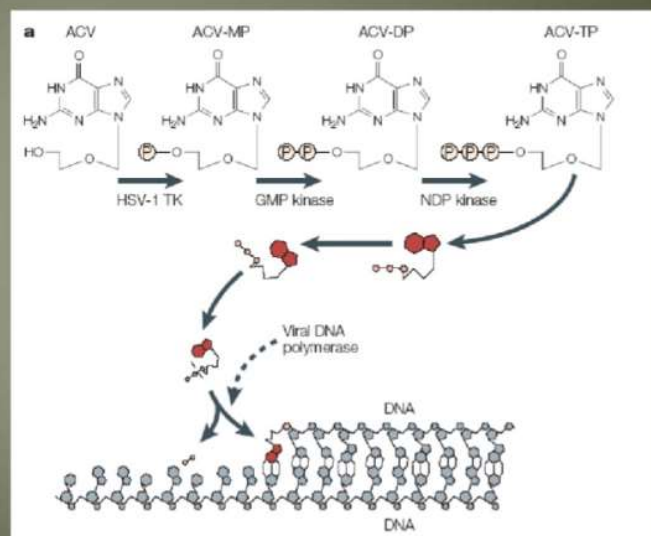


## Estrutura 1<sup>a</sup> do DNA

POLÍMERO FORMADO POR  
NUCLEOTÍDEOS



## Mecanismo de ação - Aciclovir



## Aplicações Clínicas dos Antivirais mais utilizados

<b>Anti-herpéticos</b>	Aciclovir, fanciclovir, ganciclovir, trifluridina, valganciclovir, vidarabina.	cidofovir, foscarnet, idoxuridina, brivudina.	docosanol, fomivirsen, penciclovir, valaciclovir.
<b>Anti-influenza</b>	Amantadina, oseltamivir (tamiflu®), rimantadina, zanamivir, peramivir.		
<b>Anti-hepatite</b>	Adefovir, lamivudina, entricitabina		
<b>Anti-retrovirais</b>	<b>Inibidores de proteases</b>	Saquinavir, indinavir, atazanavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir.	
	<b>Inibidores da transcriptase reversa</b>	Zidovudina, didanosina, estavudina, zalcitabina, lamivudina, abacavir, neviraparina, efavirenz, delavirdina, tenofovir e adefovir.	

## HERPESVÍRUS

Table 1 | Human herpesviruses

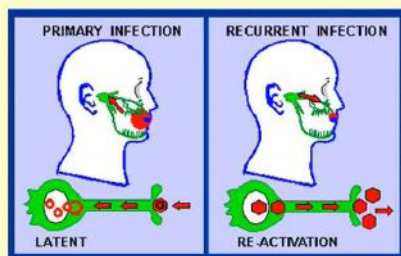
Name	Subfamily	Sequence characteristics		Cell types infected		Pathophysiology
		GC content	% coding	Lytic infection	Latent infection	
HSV-1 (HHV1)	α	68%	79	Epithelial cells	Neurons	Orofacial infections, encephalitis
HSV-2 (HHV2)	α	70%	79	Epithelial cells	Neurons	Genital and neonatal infections
VZV (HHV3)	α	46%	89	Epithelial cells	Neurons	Chickenpox, shingles
EBV (HHV4)	γ	59%	68	B cells, epithelial cells	B cells	Infectious mononucleosis, lymphoma, carcinoma
CMV (HHV5)	β	57%	79	Macrophages, lymphocytes, epithelial cells	Macrophages, lymphocytes, epithelial cells	Congenital infection, retinitis, hepatitis
HHV6	β	42%	79 (subtype A); 82 (subtype B)	CD4 <sup>+</sup> T cells	Monocytes, macrophages	Exanthem subitum
HHV7	β	36%	79	T cells	T cells	Exanthem subitum
HHV8	γ	53%	83	Lymphocytes	Lymphocytes	Kaposi's sarcoma

CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; HHV, human herpesvirus; HSV, herpes simplex virus; VZV, varicella-zoster virus.

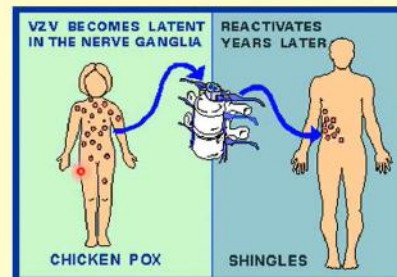
## Gingivostomatitis



### Herpes simplex



### Herpes zoster- Catapora



Latência em Gânglios Nervos sensoriais (trigêmeo/sacral)

- ❖ O Re-estímulo pode ser por um desequilíbrio hormonal ou estresse (irradiação solar, nervosismo, etc...)
- ❖ O vírus migra para região da pele através dos axônios com novo surto de replicação
- ❖ Até 3 a 4 episódios por ano, alguns até 12 vezes

### **VARICELA ZOSTER (VZV)**

**É transmitido através de inalação e contato direto, tendo como porta de entrada o trato respiratório e as membranas mucosas.  
As células alvo são as epiteliais.**



**Catapora**



**Zóster**

### **Vírus Epstein-Barr (Herpesvírus 4)**

### **VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)**

**É transmitido através da saliva e sangue, tendo como porta de entrada a corrente sanguínea e as membranas mucosas.**

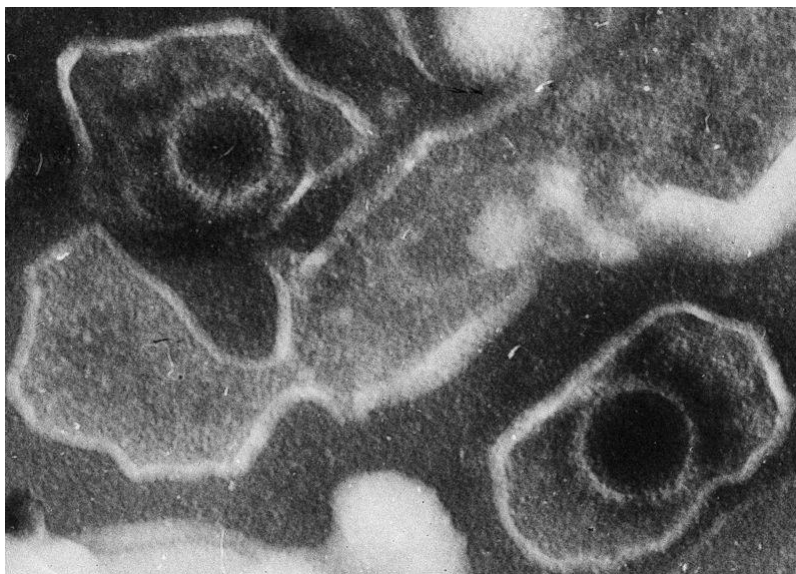
**>70% dos adultos é soropositivo.**

**As células alvo são principalmente os linfócitos B presentes na orofaringe e nasofaringe.**



**O EBV é associado ao linfoma de Burkitt (África) e ao carcinoma nasofaríngeo (Ásia).**

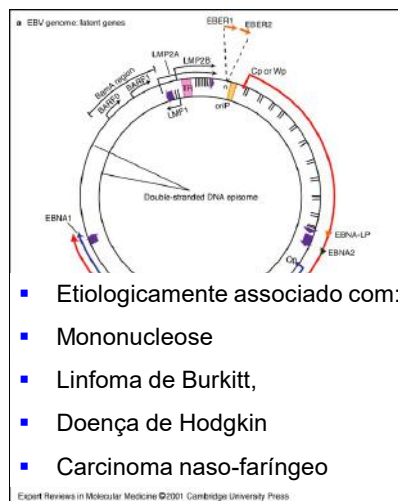
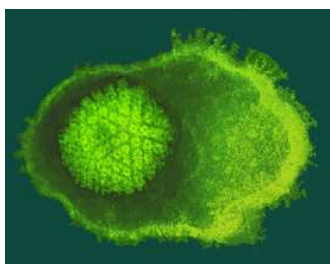
### **Vírus Epstein-Barr (EBV)**



## Vírus Epstein-Barr (EBV)

**Receptor:** CD21 (linfócitos B e células epiteliais da naso- e orofaringe)

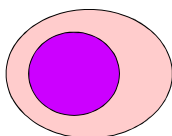
- Mais de 90% da população mundial esta infectada por este vírus.
- É transmitido pela saliva infectando as células epiteliais de orofaringe e linfócitos B.



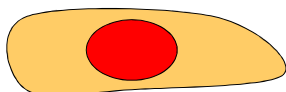
- Etiologicamente associado com:
- Mononucleose
- Linfoma de Burkitt,
- Doença de Hodgkin
- Carcinoma naso-faríngeo

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2001 Cambridge University Press

## Vírus Epstein-Barr (EBV)



Os linfócitos B são semipermissivos para a replicação viral. A infecção pode ser **latente** ou as células podem ser estimuladas e, eventualmente, transformadas pelo vírus.

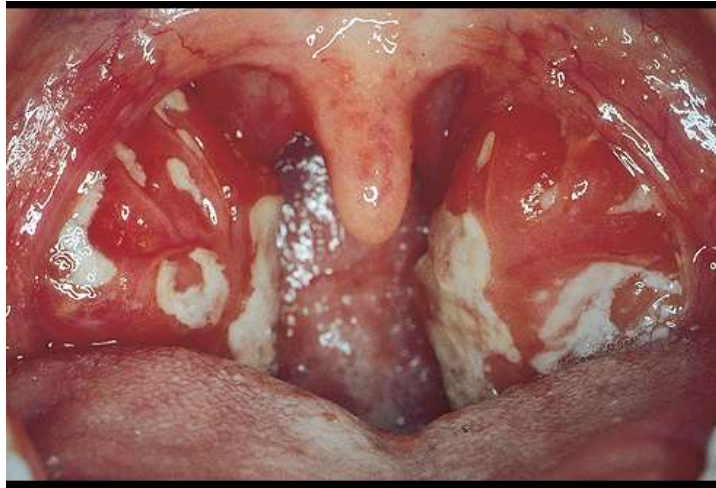


As células epiteliais permitem o ciclo lítico completo.



## Vírus Epstein-Barr (EBV)

- Mononucleose



- Faringite e adenopatias...

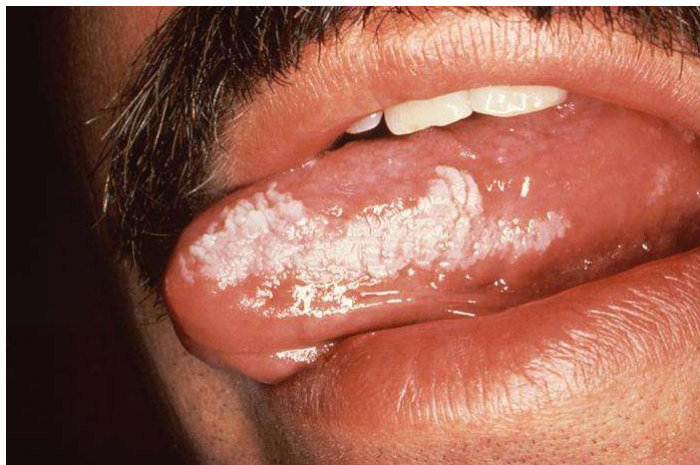
## Vírus Epstein-Barr (EBV)

Linfoma de Burkitt



**Vírus Epstein-Barr (EBV)**

**Leucoplasia pilosa**



**Vírus Epstein-Barr (EBV)**

**Leucoplasia pilosa**



## Vírus Epstein-Barr (EBV)

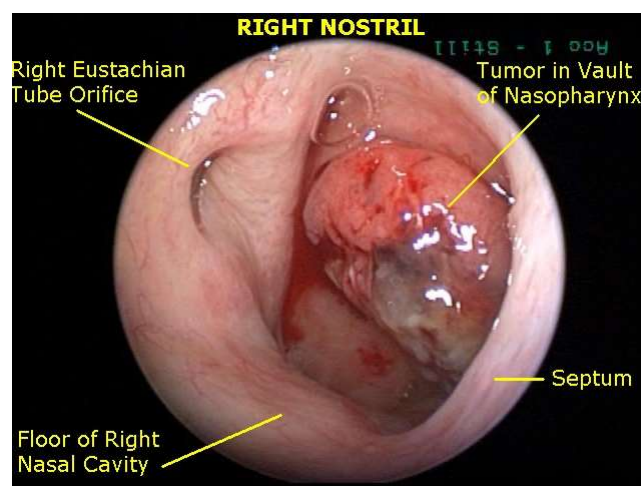
### Carcinoma nasofaríngeo

Carcinoma da nasofaringe (NPC):

- Tumor maligno do epitélio escamoso da nasofaringe.
- A forma mais indiferenciada está sempre associada à infecção por EBV.
- Cópias de EBV podem ser detectadas nas células malignas de todos os NPC indiferenciados.
- As células malignas expressam EBNA-1 (algumas LMP).
- Linhagens celulares derivadas de NPC produzem partículas virais infecciosas

## Vírus Epstein-Barr (EBV)

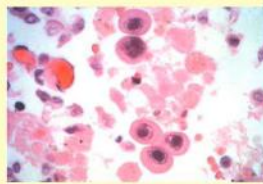
### Carcinoma nasofaríngeo



### **CITOMEGALOVÍRUS (CMV)**

**É transmitido através da saliva, sangue, urina e sêmen, tendo como porta de entrada a corrente sanguínea e as membranas mucosas (epitélio da orofaringe), além da via trans-placentária (maior risco se a mãe sofre uma infecção primária durante a gravidez).**

**As células alvo são principalmente os neutrófilos e monócitos.**



**CMV em monócitos no pulmão de um paciente com AIDS  
(coloração com HE)**

### **HERPES VÍRUS HUMANO TIPO 6 (HHV6)**

**Associado ao exantema súbito ou roséola, doença com evolução benigna, que afeta crianças de 6 meses a dois anos.**

**Latência em células T.**



**HHV7**

**Isolado em associação ao HHV6, pouco conhecido.  
Latência em células T.**

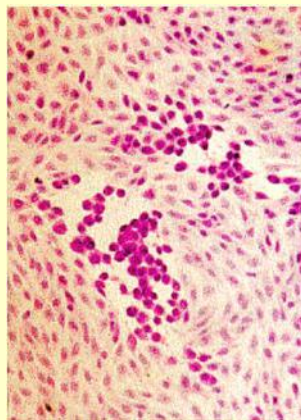
**HHV8**

**Associado a sarcoma de Kaposi em pacientes aids.**

**Latência em linfócitos B**



Tratamento com drogas não é usualmente aplicado aos HHV6 a 8.



Cytopathic Effect of HSV in cell culture: Note the ballooning of cells. (Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)

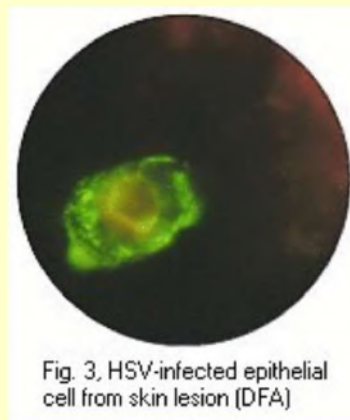


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

Positive immunofluorescence test for HSV antigen in epithelial cell. (Virology Laboratory, New-Yale Haven Hospital)



## Isolamento e Crescimento viral

Laboratório NB3 Prof Dr Klaus Eberhard Stewien ICB II-USP-SP

Forma de isolamento:

- Cultura celular com célula C6 36.
- camundongos recém-nascidos

Forma de crescimento viral:

- Cultura celular com célula C6 36.
- Cérebro de Camundongo recém-nascidos.



## Laboratório





Teste de Esterilidade

TESTE DE ESTERILIDADE  
DAS AMOSTRAS



### Diagnóstico Laboratorial de vírus

## OVOS EMBRIONADOS

Ovoscópio (movimentação/vasos sanguíneos do embrião) –  
embriões entre 5 a 16 dias;

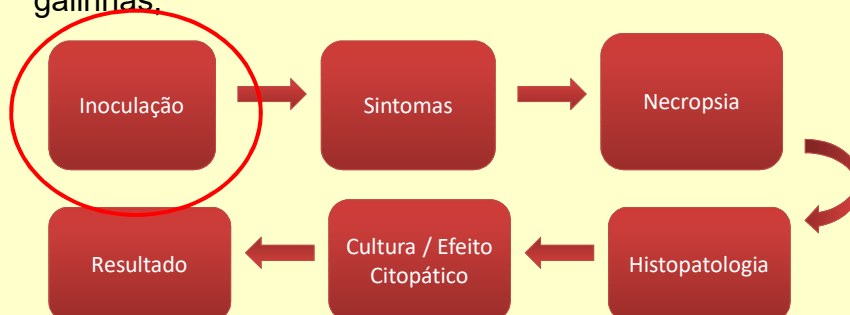


### Diagnóstico Laboratorial de vírus

## ANIMAIS VIVOS



- Utilização de animais SPF;
- camundongo, coelhos, cobaias, ratos, primatas, pintos e galinhas;







### TESTE DE INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Período de Observação

- 21 dias para cães , gatos e humanos
- 30 dias para outras espécies



(Foto: CCZ-SP)



(Foto: CCZ-SP)

Camundongo albino suíço apresentando sintomas de infecção com vírus rábico

NPR-ICB/USP

### IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

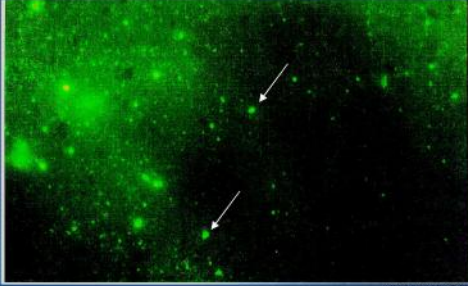


Foto: CCZ-SP

Imunofluorescência Direta - IFD (foto).  
As setas indicam inclusões em tecido nervoso típicas de infecção rábica.

NPR-ICB/USP

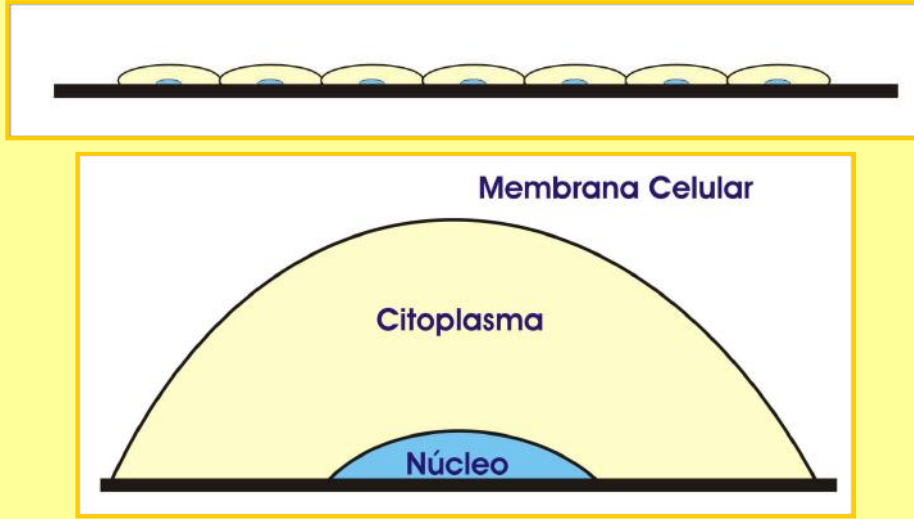
### Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Imunofluorescência

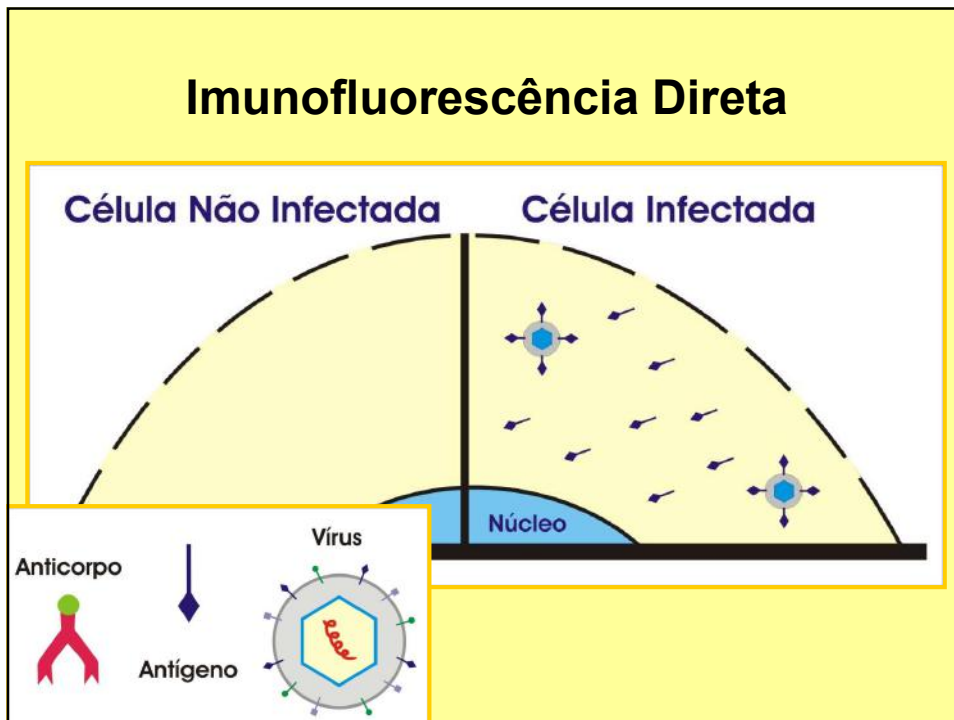


Diagnóstico Laboratorial de vírus

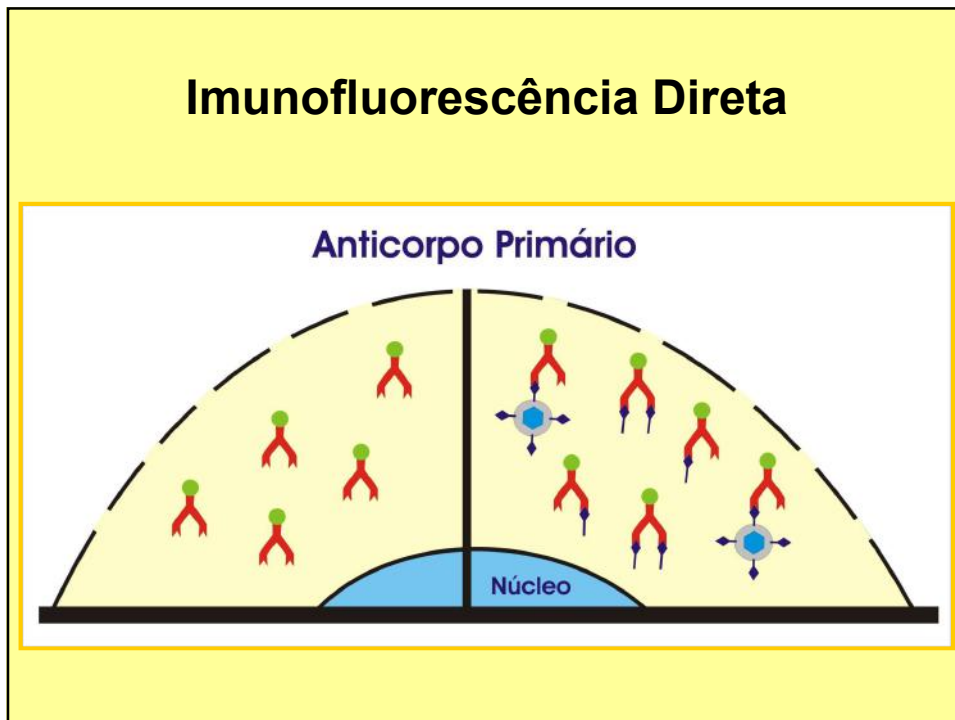
### Imunofluorescência



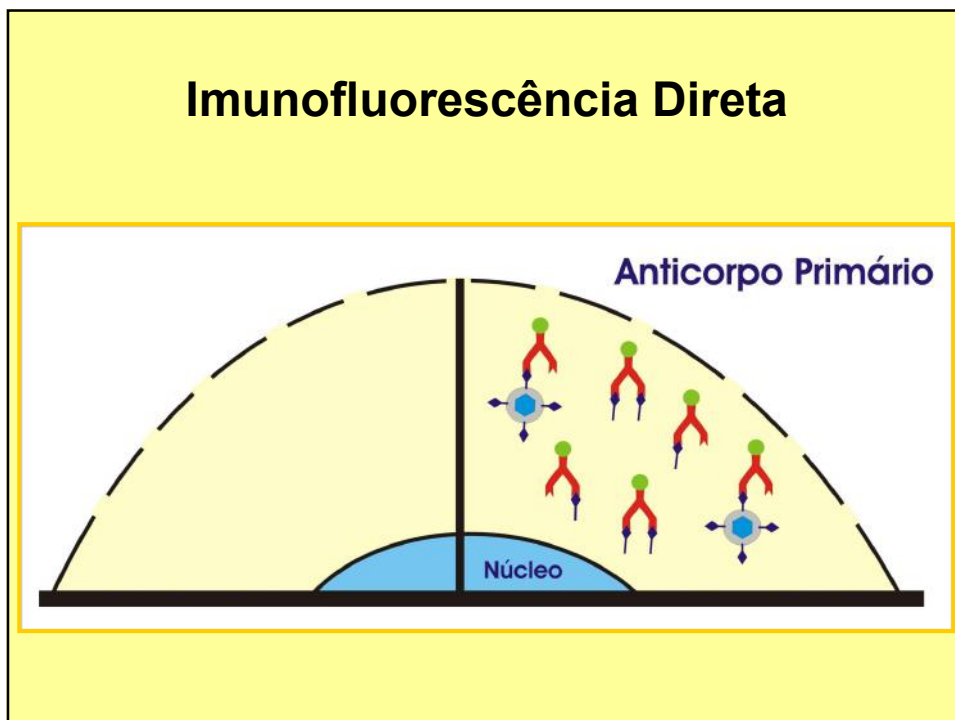
### Imunofluorescência Direta



## Imunofluorescência Direta

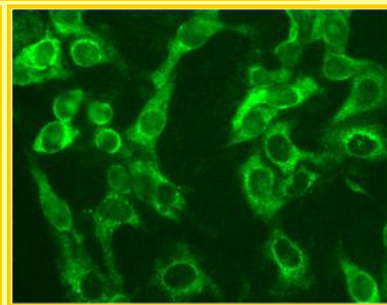
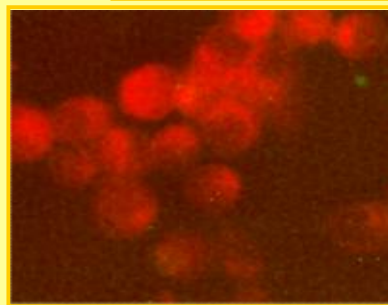
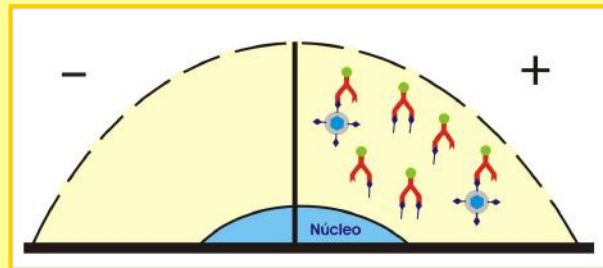


## Imunofluorescência Direta



## Imunofluorescência Direta

- Leitura

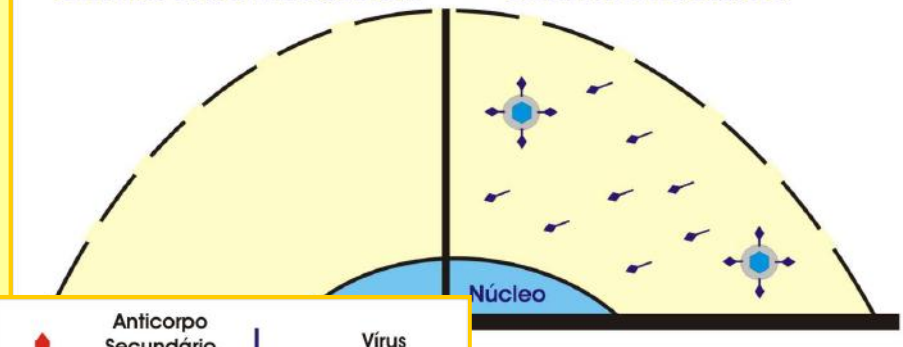


## Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Imunofluorescência Indireta

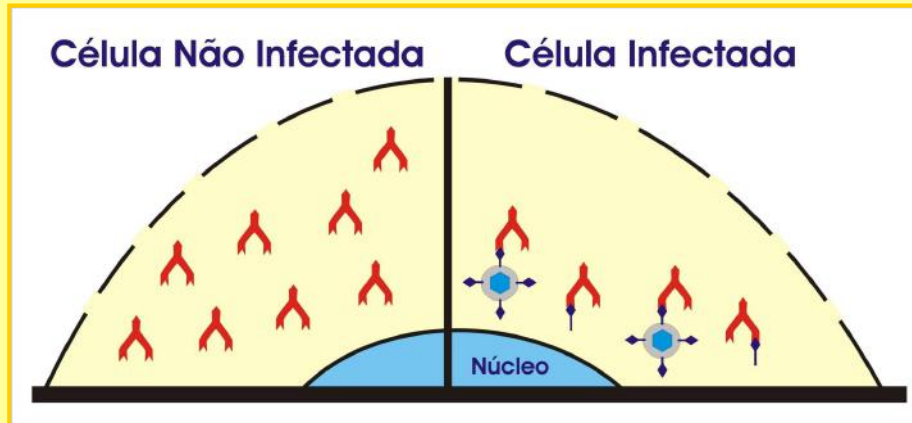
Célula Não Infectada

Célula Infectada



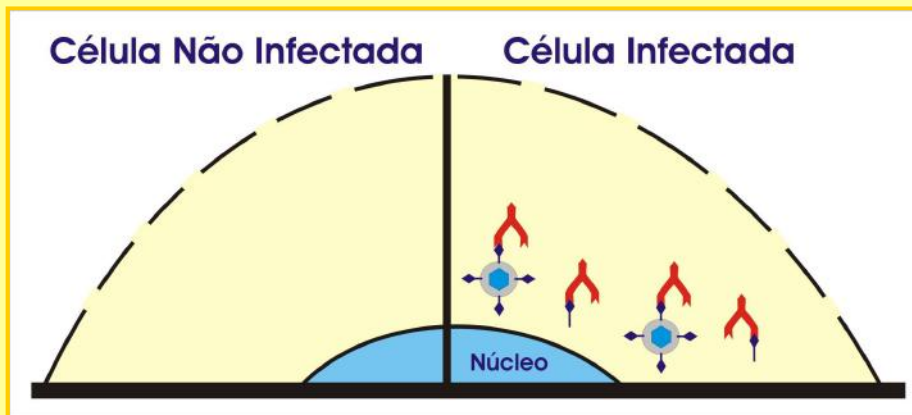
Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Imunofluorescência Indireta

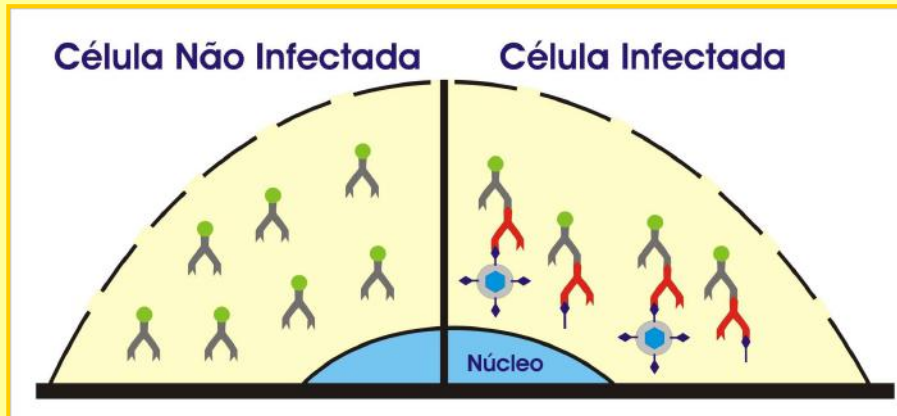


Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Imunofluorescência Indireta

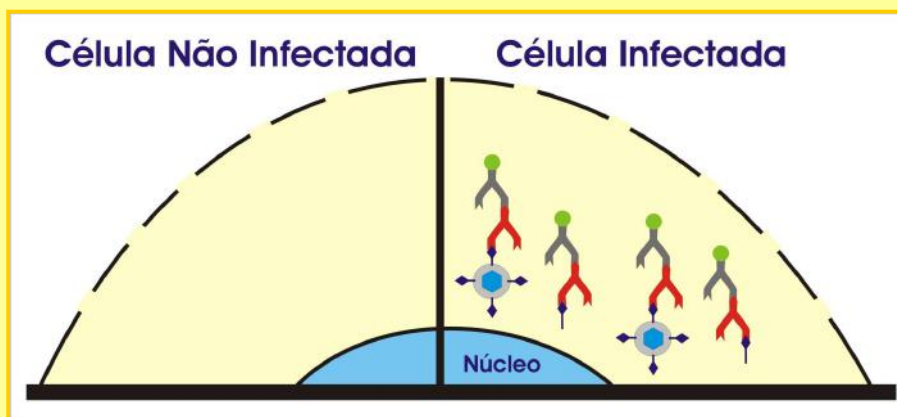


## Imunofluorescência Indireta



Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Imunofluorescência Indireta

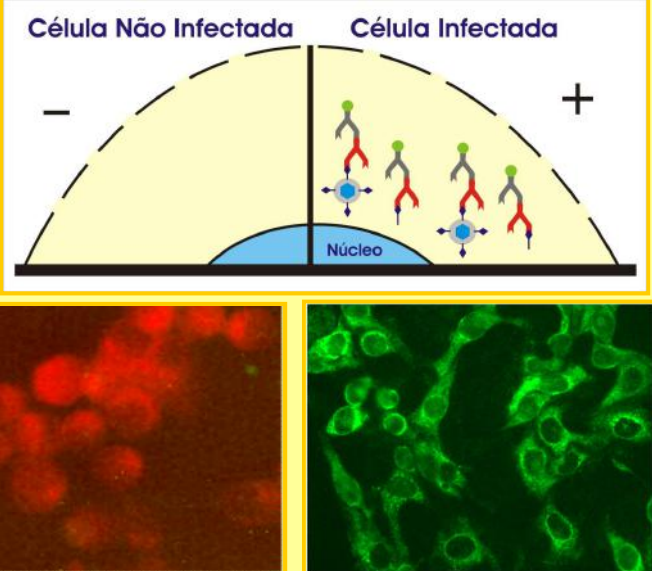




Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Imunofluorescência Indireta

- **Leitura**



## Cultivo em células animais

### HEMADSORÇÃO

- Utilizado para vírus hemaglutinantes que não geram efeito citopático
- Ex: Influenza e Parainfluenza
- Testes de aderência de hemácias em células infectadas ou vírions

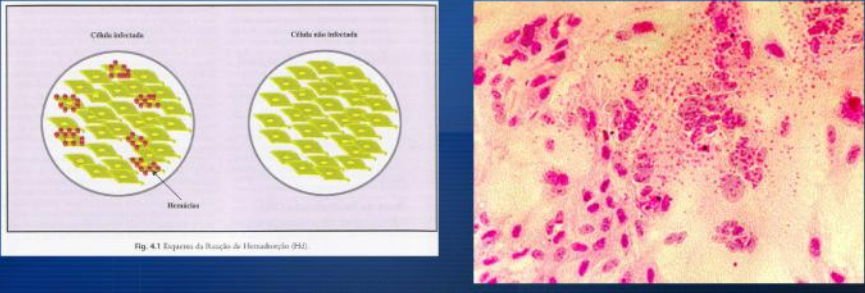
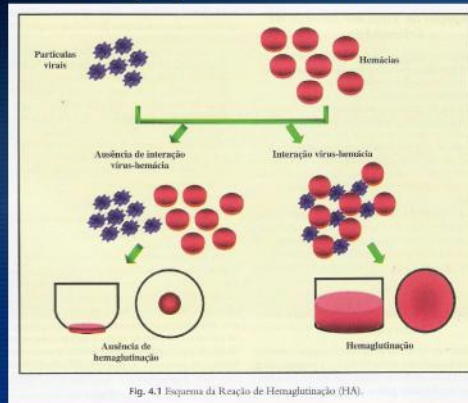


Fig. 4.1 Esquema da Reação de Hemadsorção (HA).

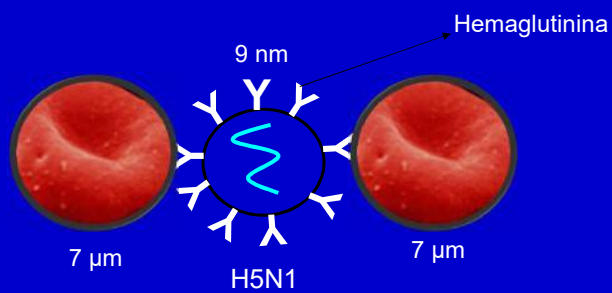
## Reação de Hemaglutinação

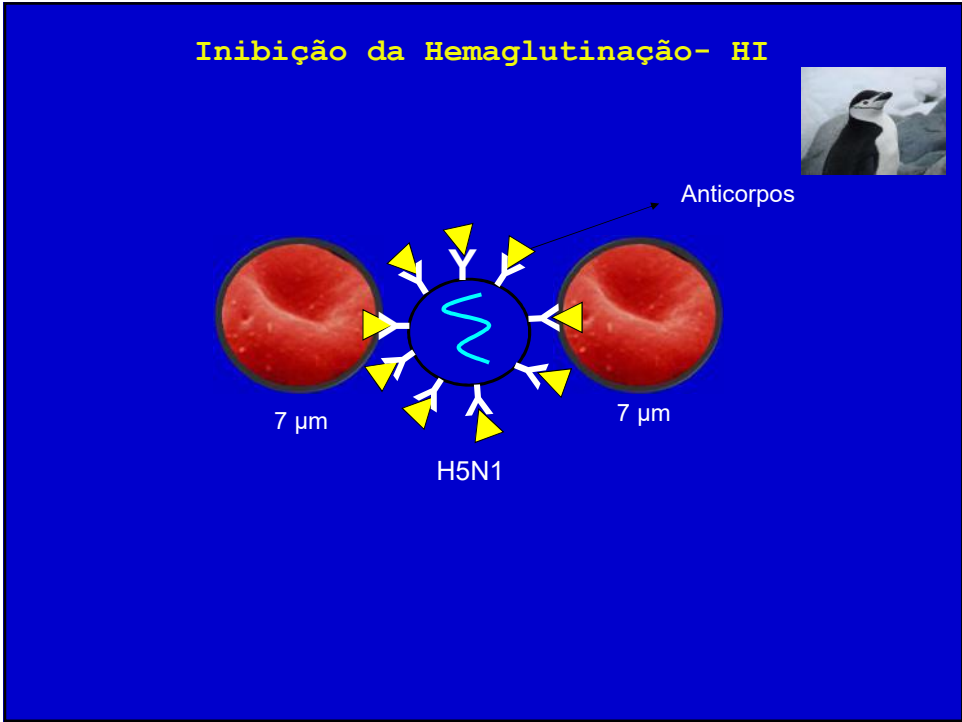
- Utilizado para vírus hemaglutinantes

- . Ligação viral a hemácias animais
- . Gera agrupamentos visíveis a olho nú



## Hemaglutinação- HA





## Sorologia

- Diagnóstico de infecções virais por medição de resposta de anticorpos
- Diagnóstico importante para viroses que:
  1. não podem ser prontamente cultivadas
  2. cultivadas lentamente (demora na liberação dos resultados)
  3. vírus não cultiváveis
- 2 tipos de anticorpos envolvidos: IgM e IgG

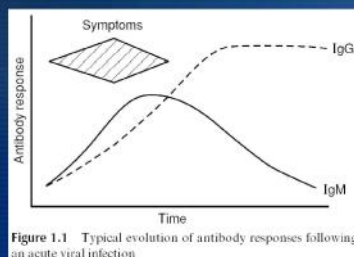


Figure 1.1 Typical evolution of antibody responses following an acute viral infection

- Evidências sorológicas de infecções agudas
  1. Soroconversão
  2. Aum/Diminuição títulos Anticorpos
  3. Presença de IgM
- Verificação da [ ] anticorpos em diferentes fases da infecção
  - aumento em 4x na [ ] indica infecção

## Sorologia

### Ensaio indiretos

- imobilização de antígenos virais em meio sólido
- anticorpos específicos do soro de pacientes ou animais se aderem ao antígeno
- anticorpos são detectados por anticorpo anti-anticorpo ligado a uma enzima

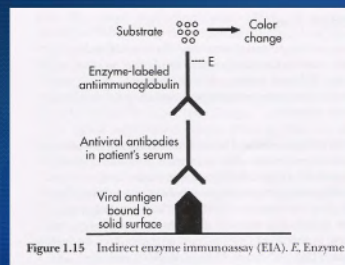


Figure 1.15 Indirect enzyme immunoassay (EIA). E, Enzyme.

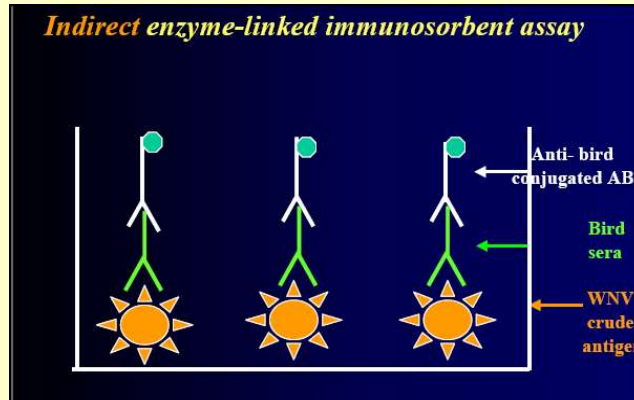
Diagnóstico Laboratorial de vírus

**ELISA**

**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**



Reação Imunoenzimática: Detecção de antígenos ou anticorpos através de conjugação enzimática



Diagnóstico Laboratorial de vírus

**ELISA**

**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**

Reação Imunoenzimática: Detecção de antígenos ou anticorpos através de conjugação enzimática



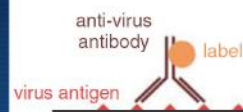
## Diagnóstico Laboratorial de vírus

### ELISA

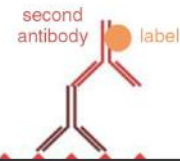


## Detecção de Antígenos Virais

Direct Test



Indirect Test



#### Vantagens:

- técnica de resultado rápido
- não requer a presença de vírus viáveis (maior flexibilidade de transporte)

#### Limitações

- não aplicáveis para todos os vírus
- . Ex: Rhinovírus (grupo com 90 sorotipos) e com reação cruzada de anticorpos
- . Ex2: presença de substâncias naturais da amostra que interferem na metodologia

## Microscopia Eletrônica

- . Única técnica viável para visualização direta de vírus
- . Útil p/ amostras com alta quantidade de partículas virais

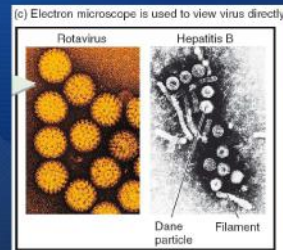
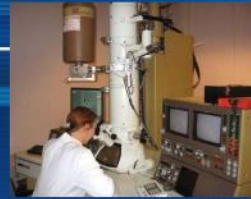
Ex: exame de fezes de pacientes com gastroenterites por rotavírus

### - Vantagens

1. Comum p/ todos os vírus
2. Detecção de vírus não cultiváveis
3. Técnica barata qto aos insumos

### - Desvantagens

1. Alta capacidade técnica (profissional bem treinado)
2. Baixa sensibilidade ( $10^6$  partículas/ml)



## Diagnósticos Moleculares

- Detecção de ácidos nucléicos específicos virais

### . Vantagens

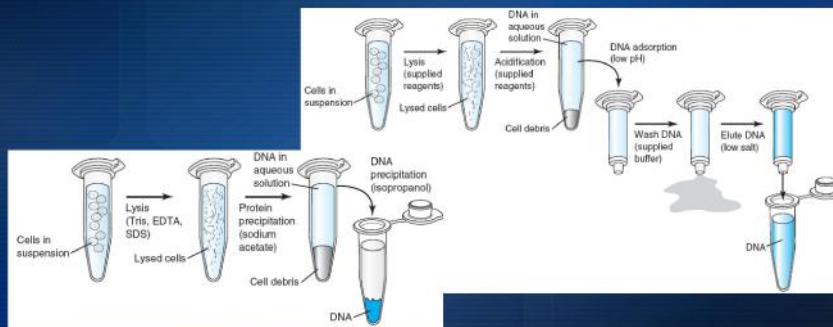
1. Possível detecção de ácidos nucléicos virais de vírus não cultiváveis
2. Grande estabilidade de ácidos nucléicos
3. Alta especificidade

- 2 categorias principais

- . Hibridização direta
- . Amplificação de um alvo específico

## Extração de ácidos nucleicos

- Isolamento do DNA ou RNA total de uma amostra  
Ex: DNA humano + DNA viral + DNA bacteriano
- Existem diferentes metodologias para extração



## Diagnóstico Laboratorial de vírus

### PCR – *POLYMERASE CHAIN REACTION* (Reação em cadeia da DNA polimerase)



**Kary B. Mullis**  
Prêmio Nobel de Química (1993)



## Diagnóstico Laboratorial de vírus

### Comparando as Reações



In vivo- Célula

**Helicase**  
**Primase**  
**DNA polimerase**  
**MgCL<sub>2</sub>**  
**Tampão**  
**dNTP**



In vitro- Microtubo

**Desnaturação**  
**Primers**  
**Ampli TAQ DNA polimerase**  
**MgCL<sub>2</sub>**  
**Tampão**  
**dNTP**

## Bactérias com potencial biotecnológico

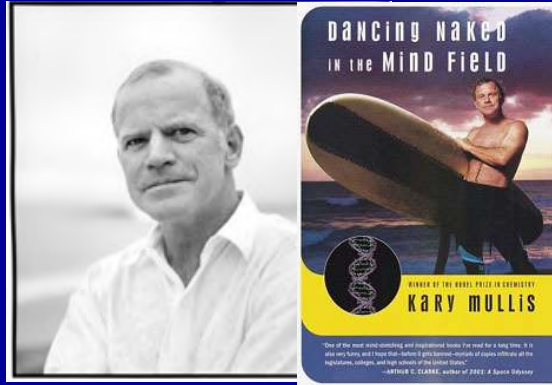
Produzem Enzimas específicas - Exemplo: *Thermus aquaticus*



Fontes Termais

## Diagnóstico Laboratorial de vírus

### Inventor da PCR



Kary B. Mullis - Antes

Kary B. Mullis- Depois

[www.karymullis.com](http://www.karymullis.com)

## Diagnóstico Laboratorial de vírus

### Requerimentos Básicos da PCR

#### Síntese de DNA *in vitro*

**DNA molde**

**Deoxinucleotídeos (dNTPs)**

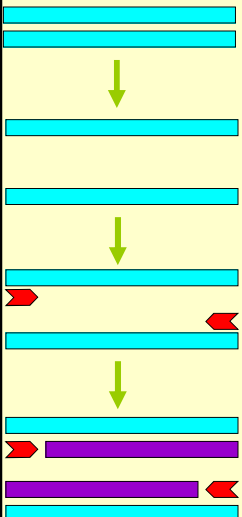
**Oligonucleotídeos (*Primers*)**

**DNA polimerase**

**Tampão (pH e Mg<sup>++</sup>)**




## PCR (Polymerase chain reaction)



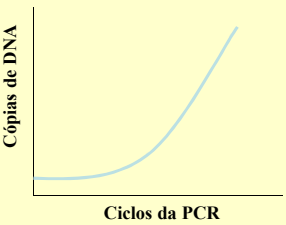
**Desnaturação (95 °C)**

**Anelamento (50-65 °C)**

**Extensão (72 °C)**




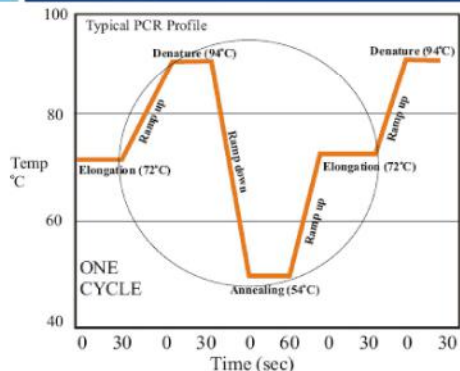
**TERMOCLADORES**



## PCR

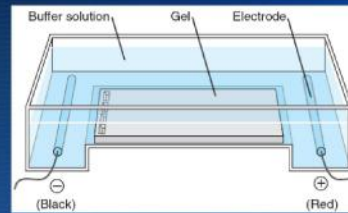
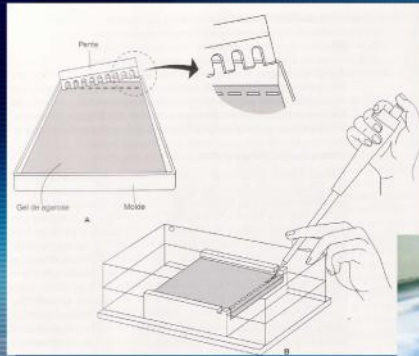
Step	Temperature (°C)	Time (sec)
Denaturation	90–96	20–60
Annealing	50–70	20–90
Extension	68–75	10–60





**Figure 1. Schematic illustration of a typical PCR temperature profile.**

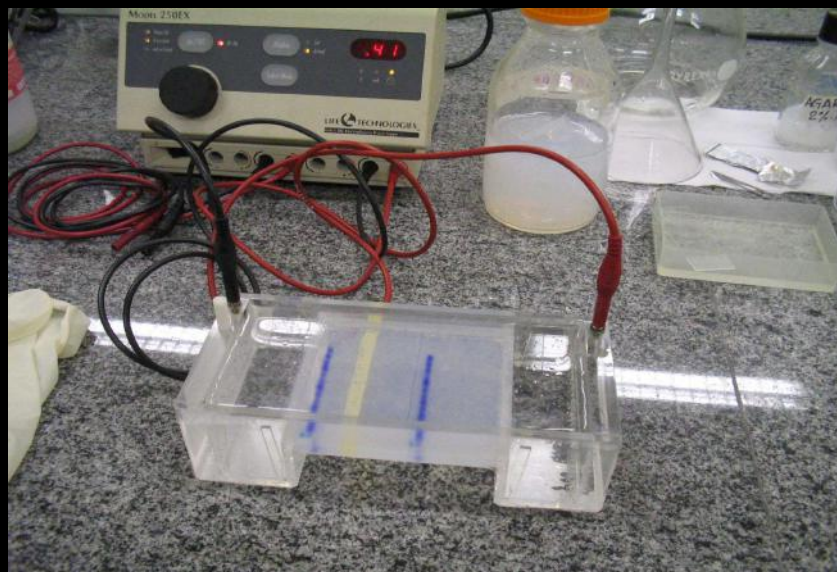
## Corrida em gel de agarose

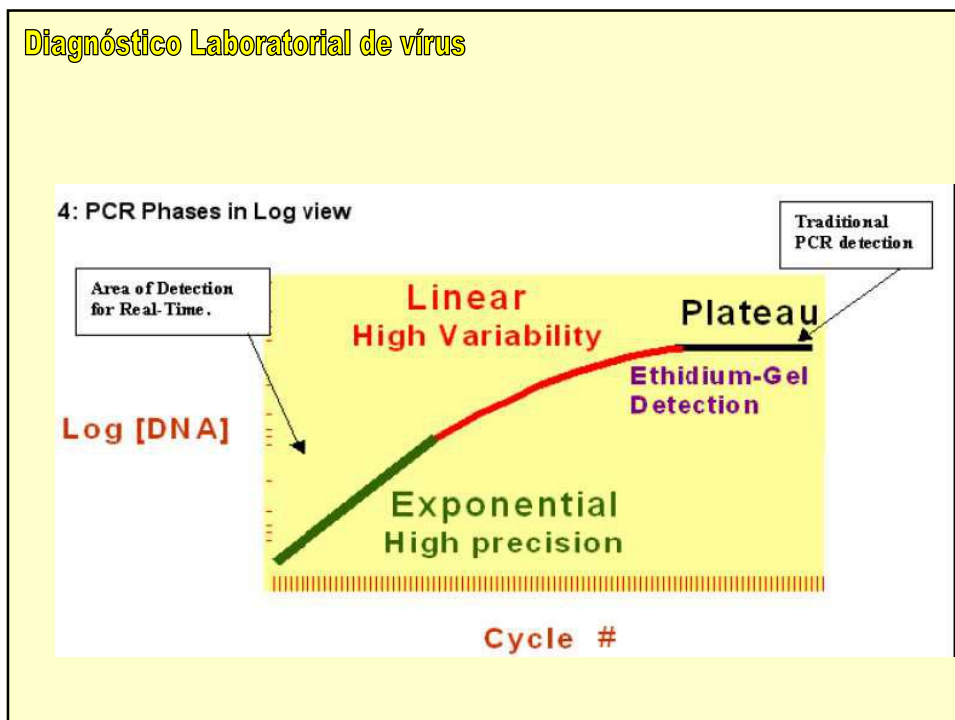
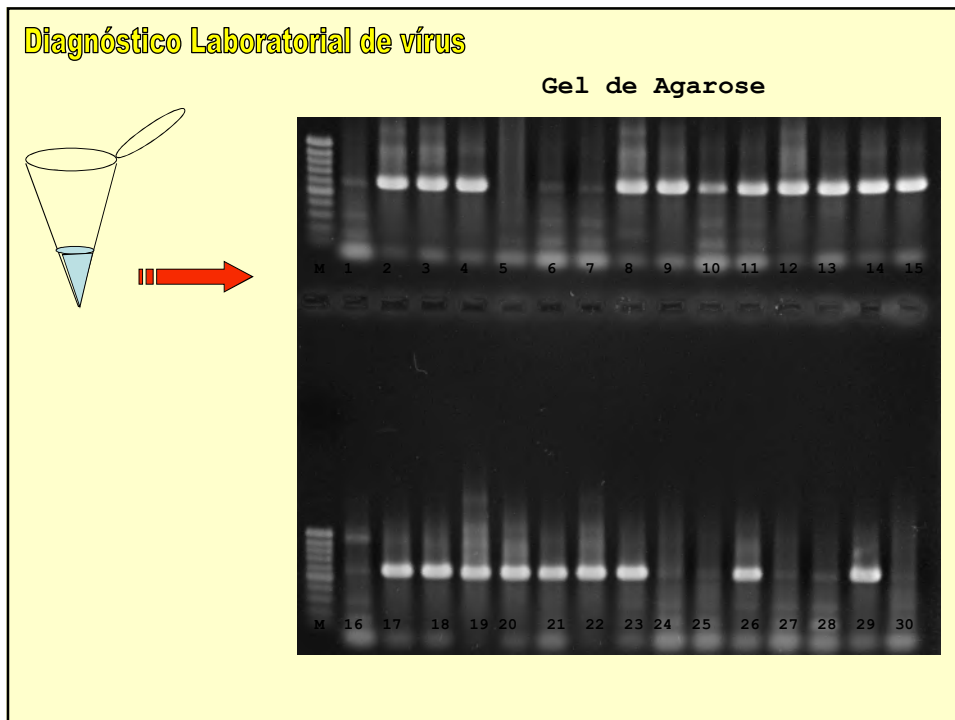


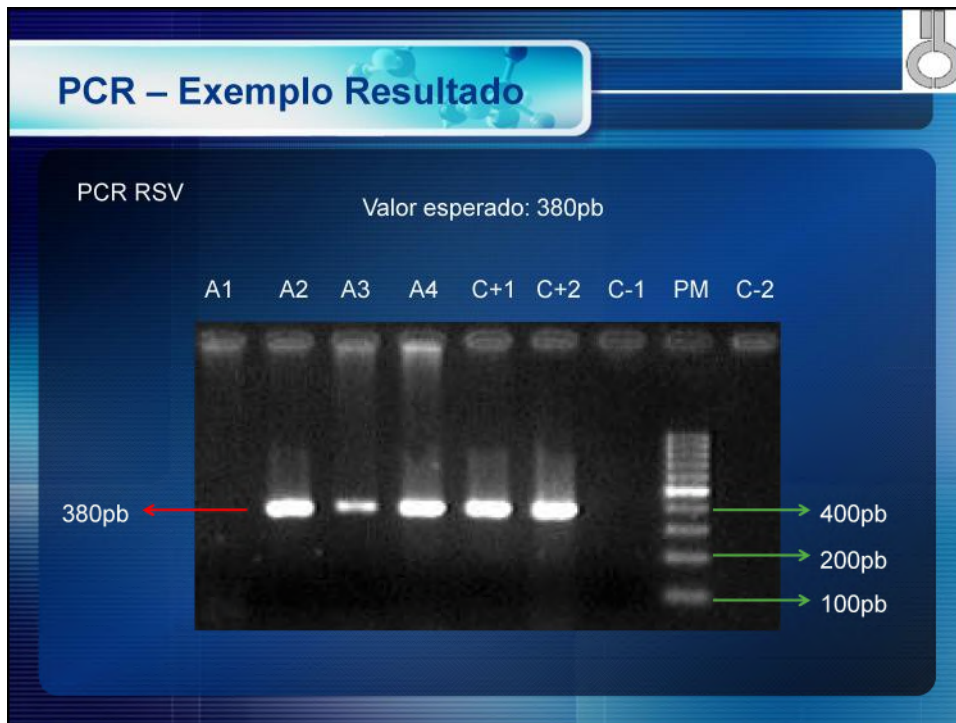
### Deteção do produto

- O produto da PCR tem tamanho conhecido, podendo ser detectado de gel agarose através da comparação com marcador de peso molecular

## Gel de Agarose







### Real-Time RT-PCR

#### Sistemas de Detecção

**Taq Man** **Sybr Green**

**Diagnóstico Laboratorial de vírus**

**Tipos de PCR em tempo real**

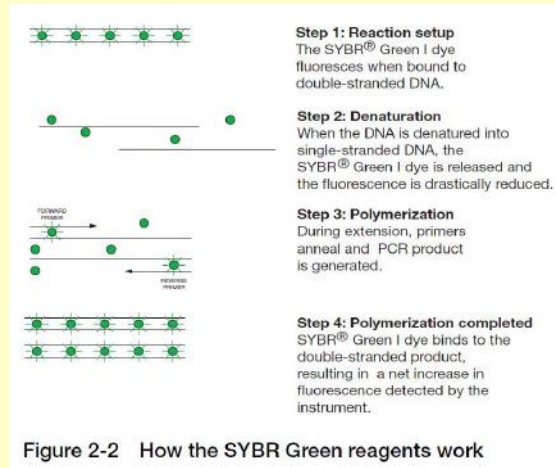
- Sem sonda (SYBR Green)
- Com sonda (Taqman, Molecular Beacons, outras)

**Sybr Green**

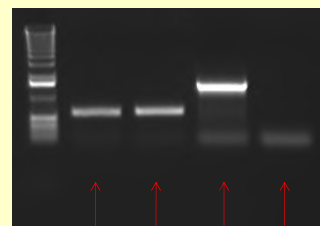
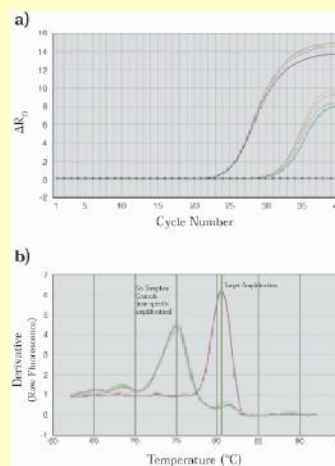
- Material Fluorescente
- Intercalante de DNA Fita dupla
- Permite fazer curva de dissociação

## Diagnóstico Laboratorial de vírus

# Método SYBR Green



## Detecção de primer dimer através da análise da curva de fusão



Reações otimizadas      Reações Não-otimizadas

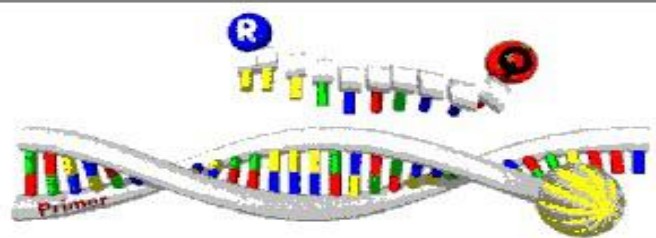
Primers dimers e produtos inespecíficos têm temperaturas de fusão distintas à do produto específico



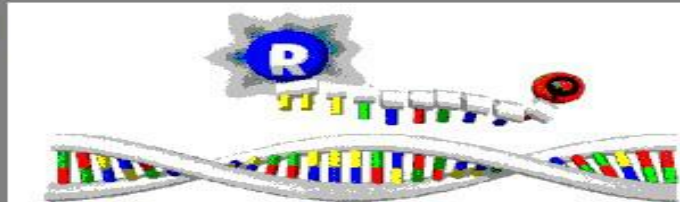
## Sonda- TaqMan

- Probe Fluorescente
- Possui moléculas especiais (Reporter-Quencher)
- Alta especificidade

3



4



Diagnóstico Laboratorial de vírus

## Características

- Permite quantificar
- Mais sensível
- Pode ser mais específico (com uso de sonda)
- Dispensa a verificação da amplificação através de eletroforese em gel de agarose

Diagnóstico Laboratorial de vírus

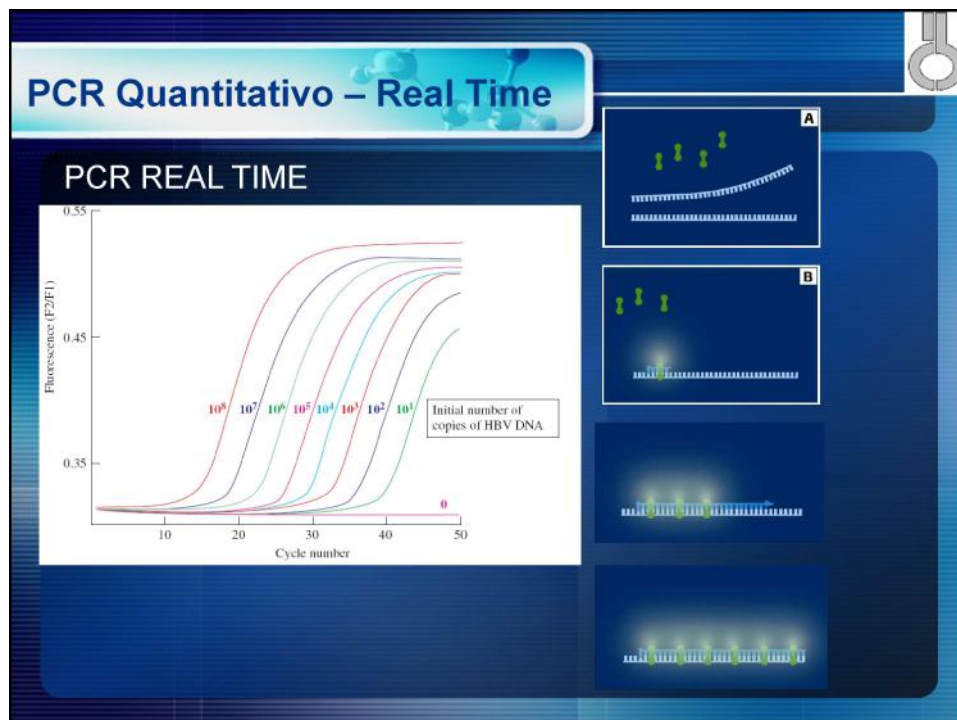
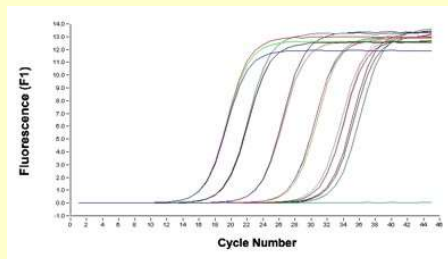
## PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR)

- Método que permite acompanhar a reação de amplificação em tempo real, através da medição da fluorescência emitida
- A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA amplificado
- Mas qual é a vantagem de poder acompanhar a reação de amplificação a cada ciclo?

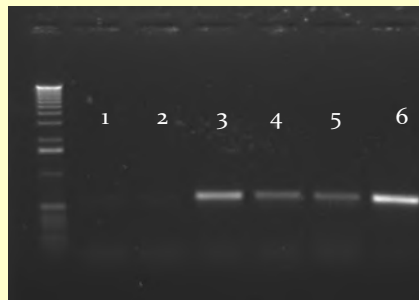
## Diagnóstico Laboratorial de vírus

### PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR)

- O acompanhamento ciclo-a-ciclo permite verificar quando a reação de amplificação atinge a fase exponencial
- Quanto antes se atinge a fase exponencial, maior a concentração do DNA inicial



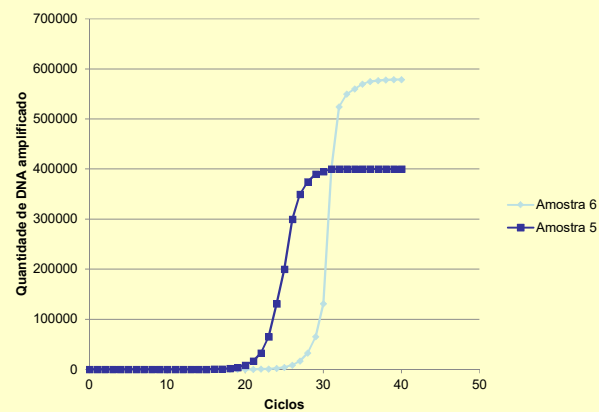
## RT-PCR para detecção do vírus X



Qual amostra tem maior quantidade do vírus Patogênico?

### Diagnóstico Laboratorial de vírus

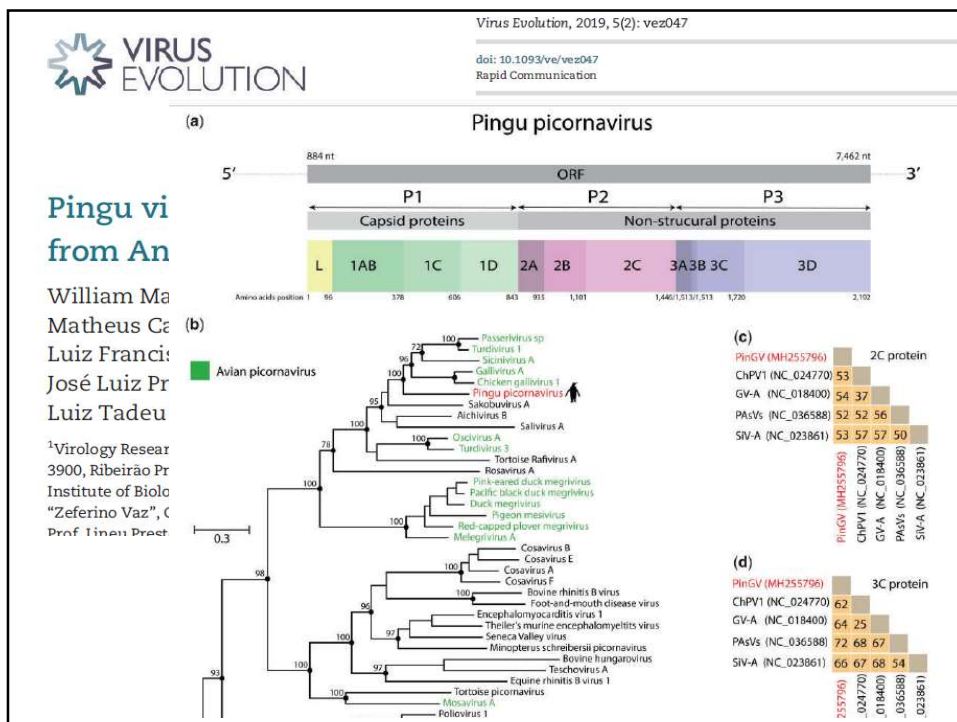
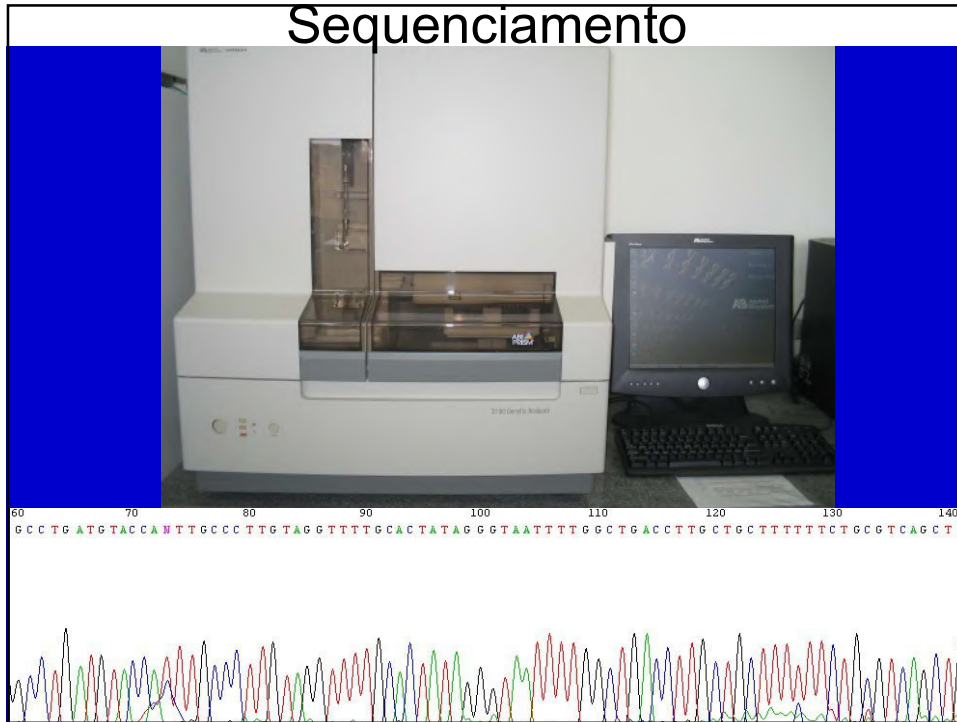
## RT-PCR para detecção do vírus X



Qual amostra amplificou maior quantidade de DNA?

Qual amostra tem maior quantidade do vírus X?

# Sequenciamento





Detection of emergent viruses in Brazilian bats by Real-time PCR & NGS.

gov.br Governo Federal

Órgãos do Governo Acesso à Informação Legislação Acessibilidade Entrar

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações

O que você procura?

Assuntos > Notícias > 2021 > 05 > Rede PREVIR-MCTI identifica e sequencia genoma de coronavírus em amostras de morcegos

REDEVÍRUS MCTI

### Rede PREVIR-MCTI identifica e sequencia genoma de coronavírus em amostras de morcegos

Identificação foi realizada por meio de exames estado de Pernambuco

Publicado em 12/05/2021 19h11 Atualizado em 18/06/21

Alphacoronavirus

Betacoronavirus

Gammacoronavirus

Deltacoronavirus

## Referências

- Trabulsi, L.R., Alterthum, F. MICROBIOLOGIA, 2015. 6ª edição. Ed. Atheneu;
- Brock Biology of Microorganisms, Global Edition. [Daniel Buckley](#), [David Stahl](#), [Kelly Bender](#), [Michael Madigan](#), [W. Sattley](#);
- Principles of Virology, Multi-Volume, 5th Edition. [Jane Flint](#), [Vincent R. Racaniello](#), [Glenn F. Rall](#), [Theodora Hatziioannou](#), [Anna Marie Skalka](#). ISBN: 978-1-683-67358-3 September 2020;
- Tortora, Gerard J. Microbiologia [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora. Berdell R. Funke, Christine L. Case ; tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian, Luis Fernando Marques Dorvillé. revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca, Ana Paula Guedes Frazzon, Jeverson Frazzon. – 12. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

125

**Obrigado pela atenção!**

E-mail: [jansentequila@usp.br](mailto:jansentequila@usp.br)