



Envio de Material para o Laboratório

⇒ Ficha Epidemiológica

Todo material deve ser acompanhado de ficha epidemiológica completa:

- nome e endereço do solicitante
- espécie do animal e histórico do caso
- existência ou não de vítima
- se houve observação do animal doente
- qual o período
- se o animal foi sacrificado ou morreu naturalmente.

NPR-ICB/USP

NORMAS DA O.M.S. PARA TRANSPORTE DE SUBSTÂNCIAS INFECCIOSAS

SUBSTÂNCIAS INFECCIOSAS

- são aquelas conhecidas ou sobre as quais se tenha uma “suspeita” razoável de conter patógenos (vírus prions, bactérias fungos parasitas, toxinas, etc)
- embalagens contendo essas substâncias devem usar o símbolo de risco biológico

NPR-ICB/USP

TRANSPORTE DE AMOSTRAS

- Cuidados que assegurem integridade, conservação e inviolabilidade



Foto CCZ-PMSP



Foto CCZ-PMSP

NPR-ICB/USP

ACONDICIONAMENTO DE SUBSTÂNCIA INFECCIOSA PARA TRANSPORTE



Fonte: Laboratory biosafety manual, second edition, WHO1993.

NPR-ICB/USP

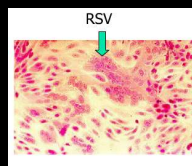




Diagnóstico Laboratorial de vírus

- Métodos clássicos
 - Isolamento e Identificação viral

1. Culturas Celulares



2. Ovos embrionados



1. Inoculação em animais



Isolamento em cultura de células

- ❑ Neuroblastoma de camundongos (N2a)
- ❑ Vírus da raiva



Fotos:
LabZooVis

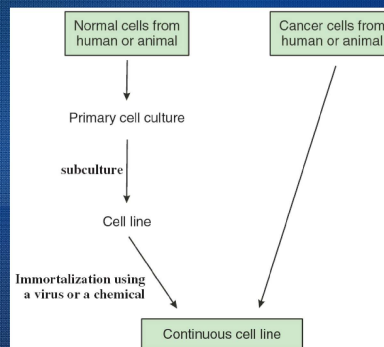


NPR-ICB/USP

Cultivo em células animais

- Método altamente desenvolvido para células humanas e animais
- Células são cultivadas em meios de cultura contendo nutrientes essenciais

Culture type	Viruses supported
Primary	
Monkey kidney	Influenza Parainfluenza Enteroviruses
Rabbit kidney Human embryonic kidney	Herpes simplex Adenovirus Enteroviruses
Diploid	
Fibroblast	Cytomegalovirus Varicella-zoster Herpes simplex Rhinovirus Enteroviruses (some) Adenovirus Respiratory syncytial
Continuous	
HEp-2	Respiratory syncytial Adenovirus Herpes simplex Parainfluenza (some) Enteroviruses (some)
A549	Herpes simplex Adenovirus Enteroviruses
MDCK	Influenza



Cultivo em células animais

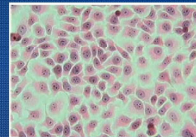
Efeito citopático

- Diagnóstico baseado na presença de alterações na cultura celular
- Diferentes efeitos citopáticos são observados para diferentes vírus

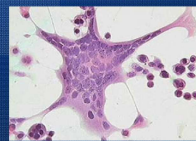
TABLE 6.5

Cytopathic Changes in Selected Virus-Infected Animal Cells

Virus	Response in Animal Cell
Smallpox virus	Cells round up; inclusions appear in cytoplasm
Herpes simplex	Cells fuse to form multinucleated giant cells; nuclear inclusions
Adenovirus	Clumping of cells; nuclear inclusions
Poliovirus	Cell lysis; no inclusions
Reovirus	Cell enlargement; vacuoles and inclusions in cytoplasm
Influenza virus	Cells round up; no inclusions
Rabies virus	No change in cell shape; cytoplasmic inclusions (Negri bodies)
HIV	Giant cells with numerous nuclei (multinucleate)



C-: 400x



C+ Herpes: 400x

Cultivo em células animais

Table 1.1 Virus isolation

Advantages	Disadvantages
Sensitive	Slow (conventional cell culture)
"Catch all"	Labour intensive
Generates isolate for further study	Multiple cell lines required
Detects 'viable' virus	
Adaptation for rapid result	

Desvantagens adicionais

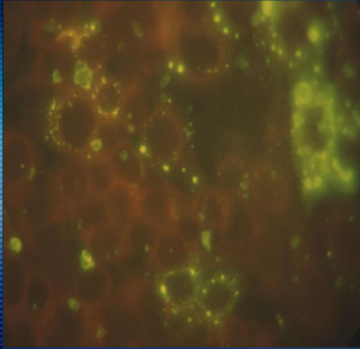
- Nem todos os vírus são cultiváveis
- Nem todos os vírus produzem efeito característico
- Depende de vírus viáveis
- Resultado demorado p/ alguns tipos virais

Table 1.1 Time Required to Detect Viruses in Cell Culture

Virus	Number of isolates	Earliest day positive	Day when 50% positive	Day when 90% positive
Herpes simplex	512	1	1	3
Varicella-zoster	30*	3	7	13
Cytomegalovirus	116†	3	13	20
Adenovirus	125‡	1	4	11
Enteroviruses	85	1	4	10
Respiratory syncytial	70§	2	4	7
Influenza	61	2	4	7
Parainfluenza	104¶	1	6	12
Rhinovirus	130	1	6	12

Isolamento em cultura de células

- BHK-21
- Vírus da raiva



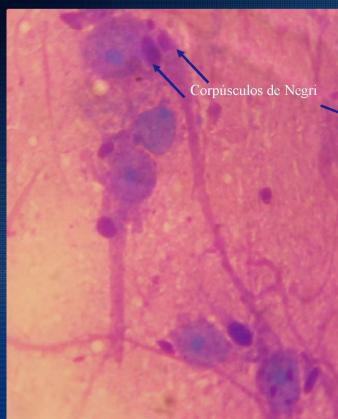
- ↑ sensibilidade
- ↑ especificidade

- Tempo reduzido para obtenção de resultados (2 a 3 dias)

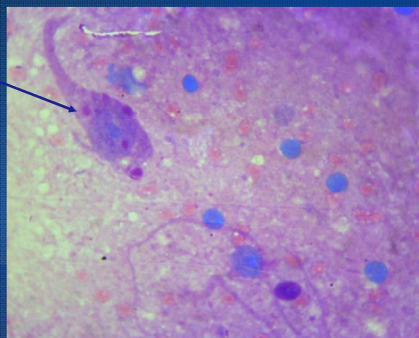
NPR-ICB/USP

Histopatológico

Ex: Raiva (Método Histopatológico de Sellers)



Corpúsculos de Negri



Fotos: www.patologiaveterinaria.com

IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

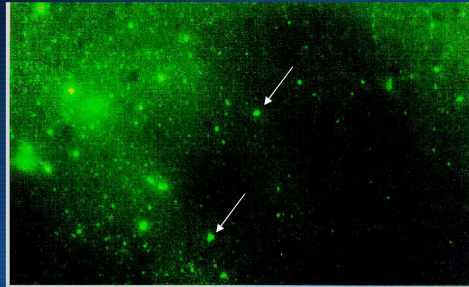


Foto: CCZ-SP

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

NPR-ICB/USP

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

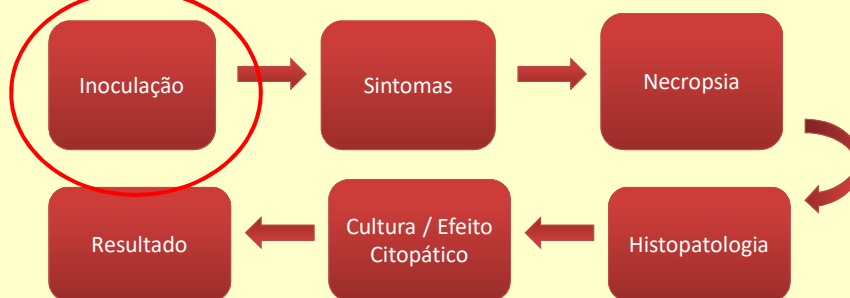


Fig. 4.1 Esquema da Reação de Hemadsorção (54).

Diagnóstico Laboratorial de vírus ANIMAIS VIVOS



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



Diagnóstico Laboratorial de vírus



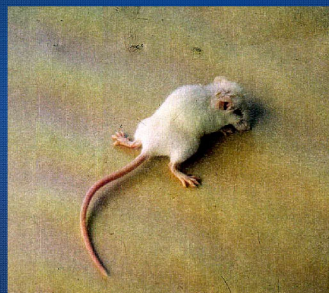
TESTE DE INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

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

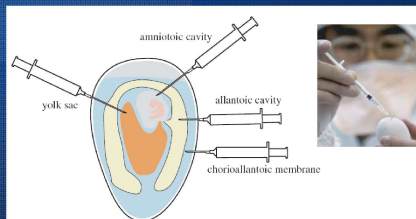
NPR-ICB/USP

Métodos de Isolamento e Cultivo viral

-Permite a produção e isolamento viral

-Possível em:

1. Organismos (larvas de inseto, ratos, coelhos) - *In vivo*
2. Ovos embrionados - *In vivo*
3. Cultura de células animais - *In vitro*



Inoculação em Ovo Embrionado

Descoberta de forma independente em 1941 por HIRST e McCLELLAND



Hirst GK 1941. Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94: 22-23.

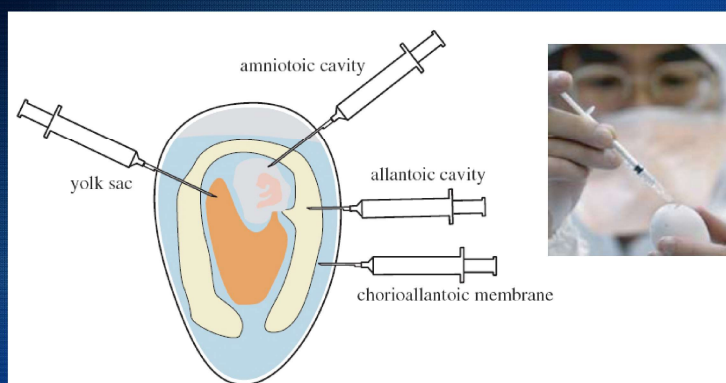
McClelland L, Hare R 1941. The adsorption of influenza virus by red cells and a new *in vitro* method of measuring antibodies for influenza virus. *Canad J Publ Hlth* 32: 530-538.

Inoculação em Ovo Embrionado

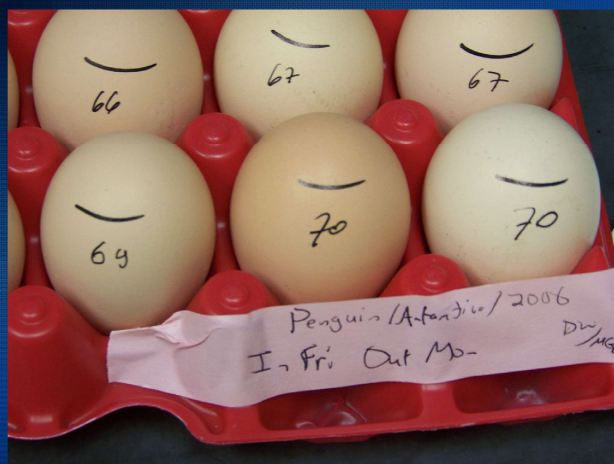
- A capacidade de certos vírus de se replicar em células de ovo embrionado.
- Os vírus da influenza e NewCastle são inoculados na cavidade alantóica.
- Técnica “Padrão Ouro”

Diagnóstico Laboratorial de vírus**OVOS EMBRIONADOS**

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

**Inoculação em Ovos Embrionados**

Marcação do Ovo



Seringas - antibiótico



Perfuração da casca do ovo



Inoculação das amostras



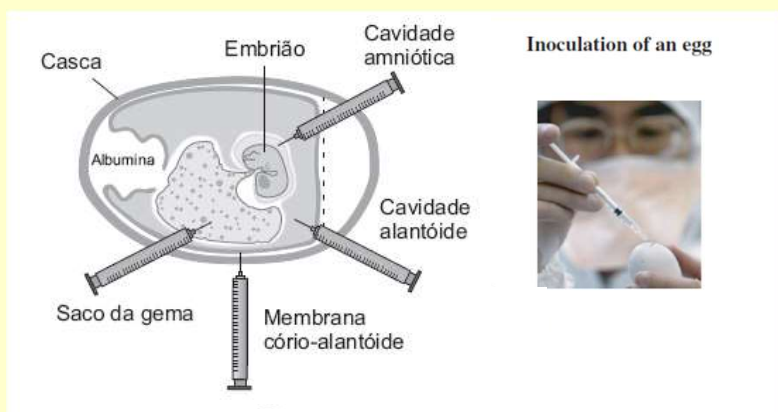
Utilização da Parafina



Diagnóstico Laboratorial de vírus

OVOS EMBRIONADOS

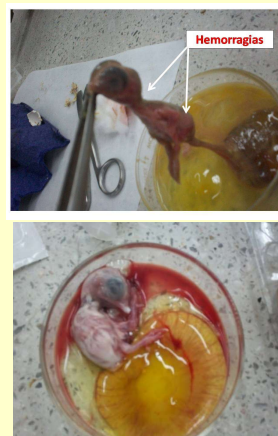
Vias de inoculação de acordo com o tipo de vírus (Ex.: membrana corioalantóide para herpesvírus);



Diagnóstico Laboratorial de vírus

OVOS EMBRIONADOS

Observa-se alterações no embrião:
Hemorragias, lesões esbranquiçadas e morte



Diagnóstico Laboratorial de vírus

OVOS EMBRIONADOS

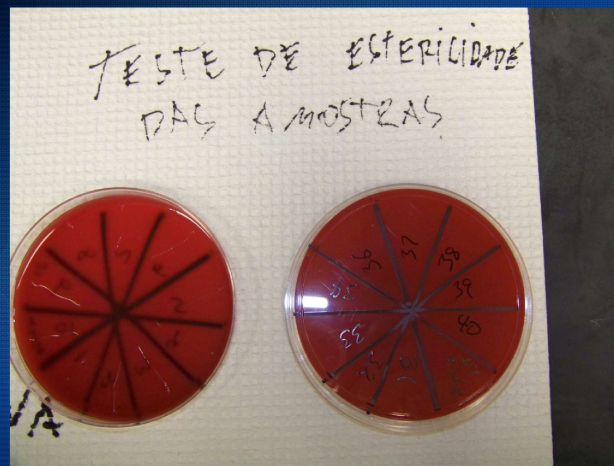
- Vantagens:
 - econômico;
 - utilizável para uma grande variedade de vírus;
 - produção de vacinas (influenza A, varíola e febre amarela).



- Desvantagens:
 - vírus com alto período de latência;
 - necessidade de ovos SPF;
 - técnica trabalhosa;
 - necessidade de equipamentos específicos.



Teste de Esterilidade



Reação de Hemaglutinação

- Utilizado para vírus hemaglutinantes
- . Ligação viral a hemácias animais
- . Gera agrupamentos visíveis a olho nú

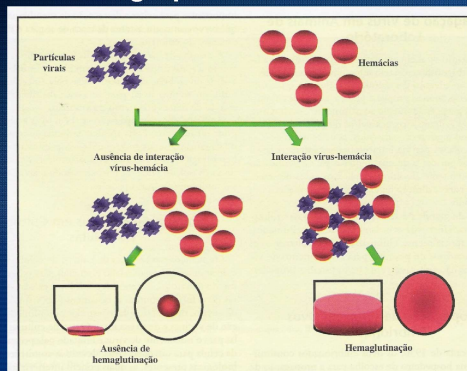
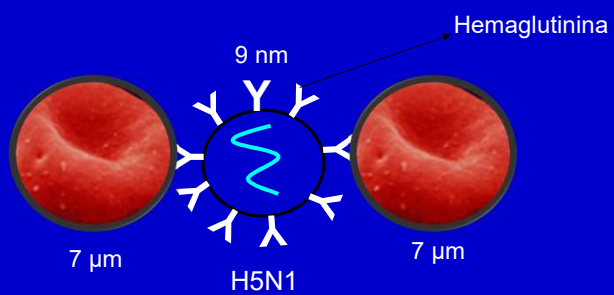


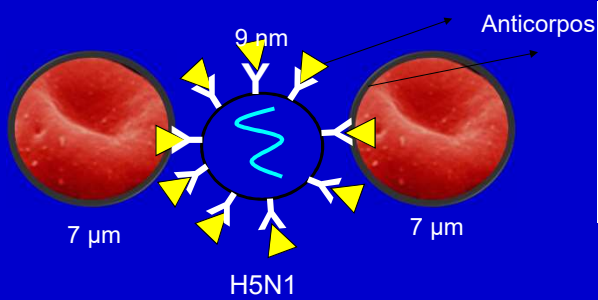
Fig. 4.1 Esquema da Reação de Hemaglutinação (HA).



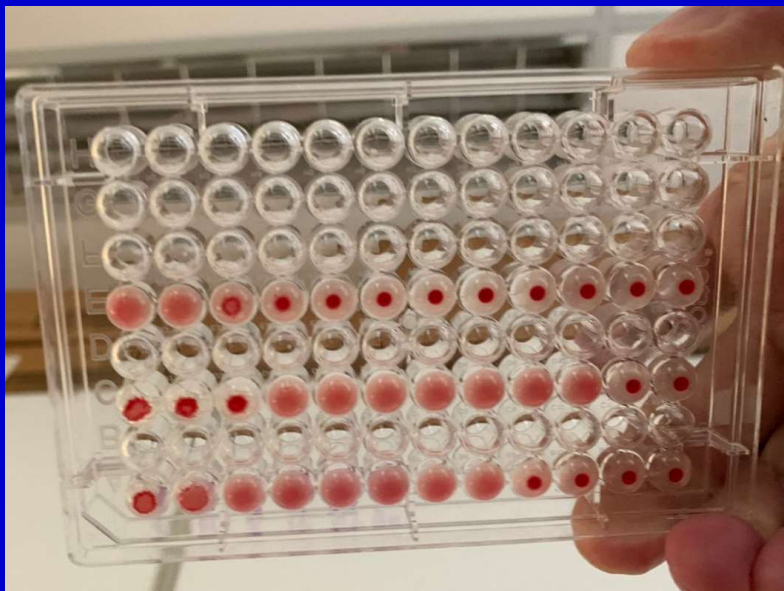
Hemaglutinação- HA



Inibição da Hemaglutinação- HI

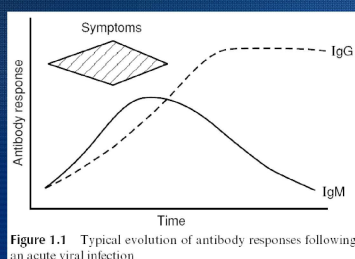


HEMAGGLUTINATION-INHIBITION TEST



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



-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

Soroneutralização em cultura de células BHK21

(SMITH et al., 1973 / FAVORETTO et al., 1992 / OIE desde 2006)

Prova *in vitro* – Detecção de anticorpos neutralizantes

- o ↑ sensibilidade ↑ especificidade
- o Tempo para obtenção de resultados (48 horas)

Foto CCZ-PMSP

Foto CCZ-PMSP

Foto CCZ-PMSP

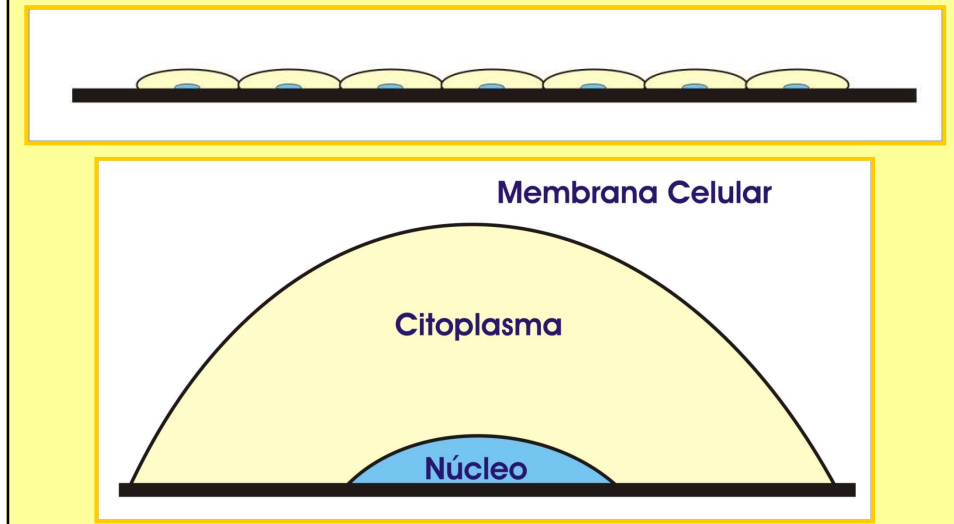
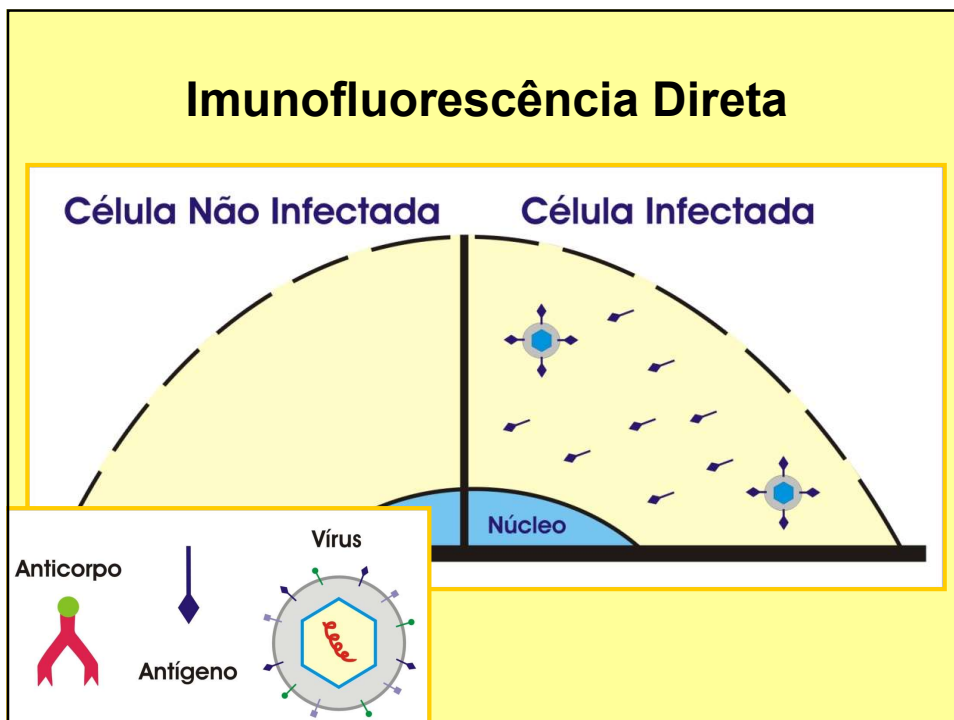
Células Infectadas com vírus da raiva submetidas a IFD

NPR-ICB/USP

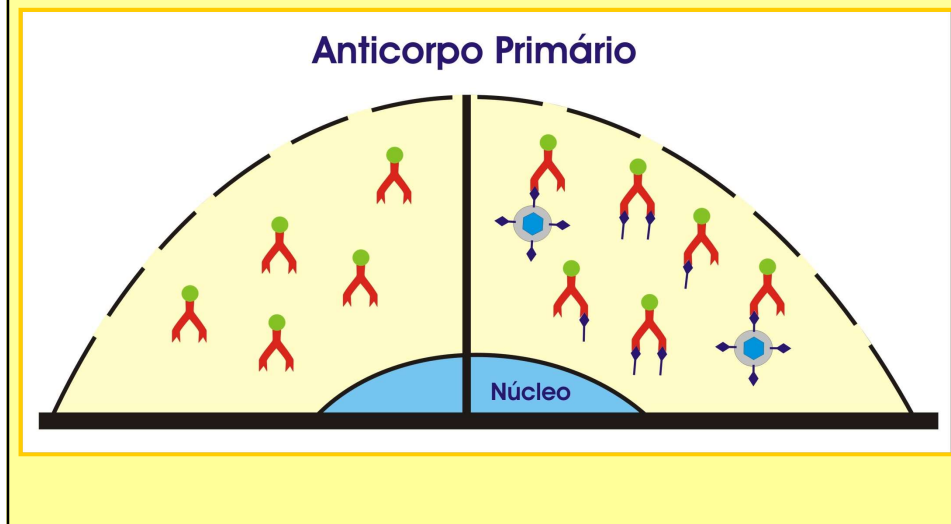
Diagnóstico Laboratorial de vírus

Imunofluorescência

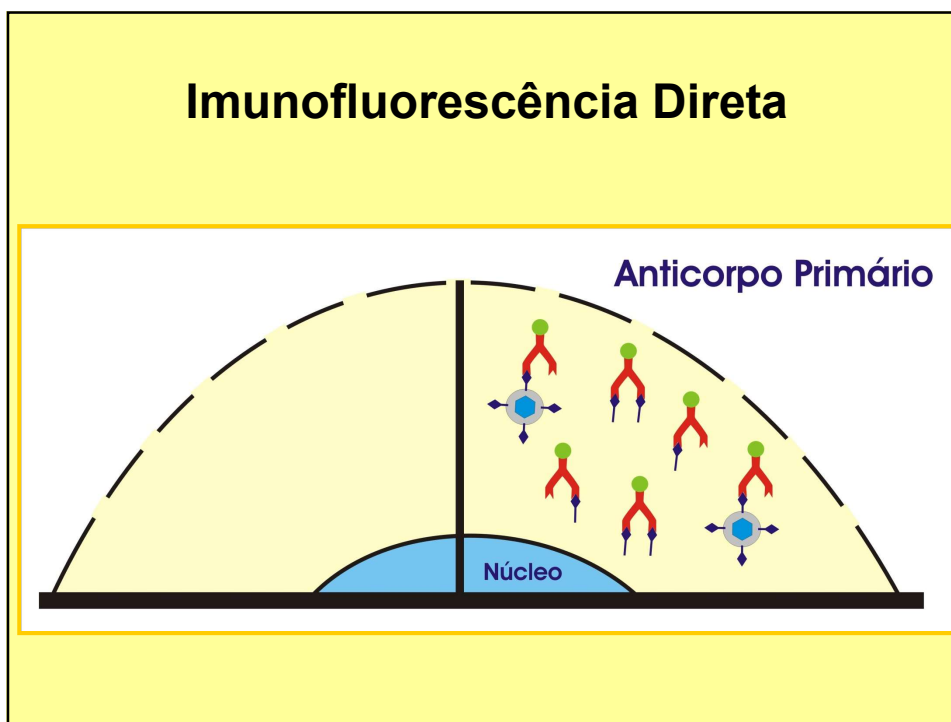
Diagnóstico Laboratorial de vírus

Imunofluorescência**Imunofluorescência Direta**

Imunofluorescência Direta

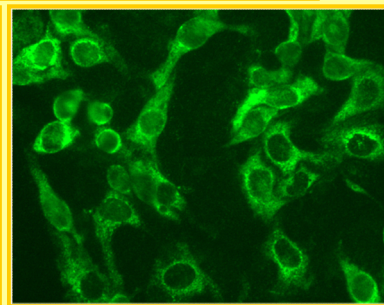
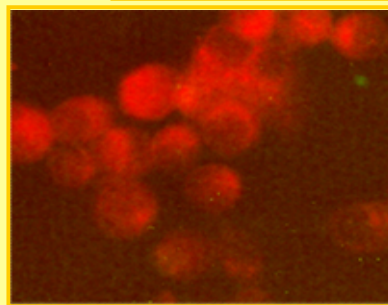
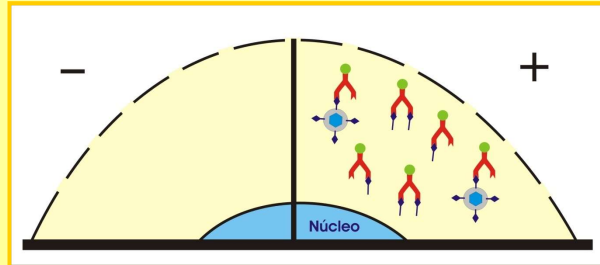


Imunofluorescência Direta



Imunofluorescência Direta

- Leitura

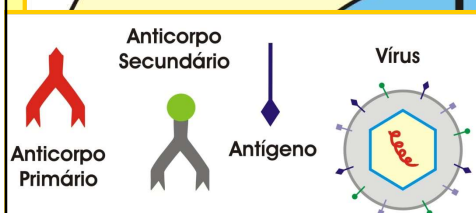
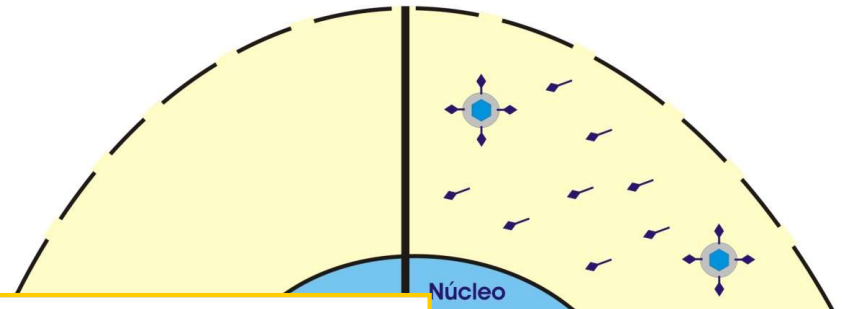


Diagnóstico Laboratorial de vírus

Imunofluorescência Indireta

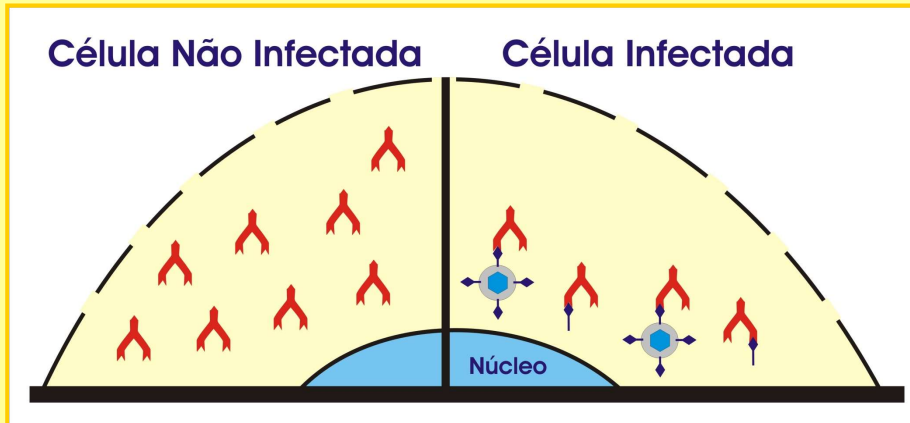
Célula Não Infectada

Célula Infectada



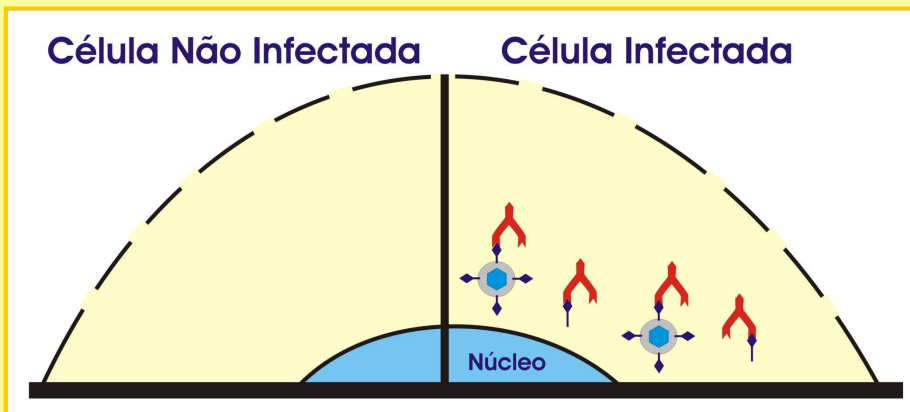
Diagnóstico Laboratorial de vírus

Imunofluorescência Indireta

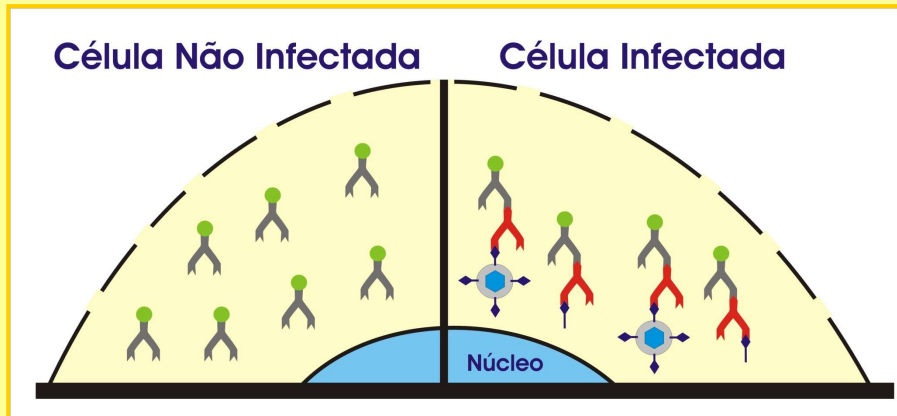


Diagnóstico Laboratorial de vírus

Imunofluorescência Indireta

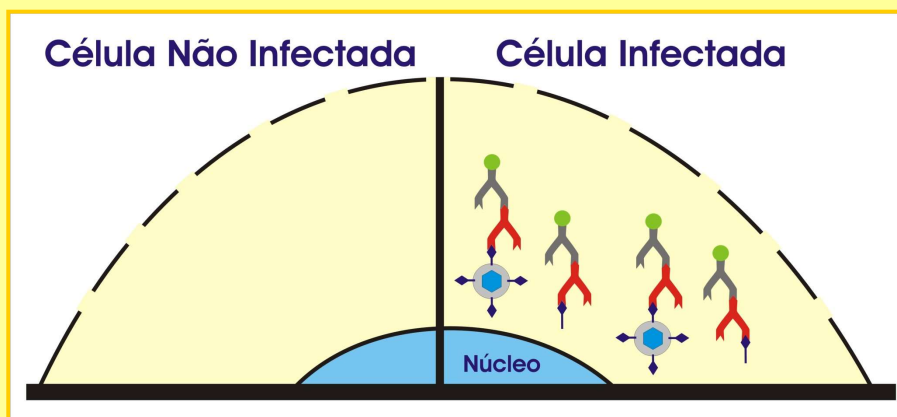


Imunofluorescência Indireta



Diagnóstico Laboratorial de vírus

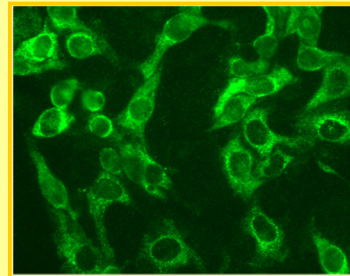
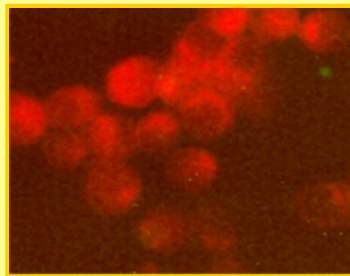
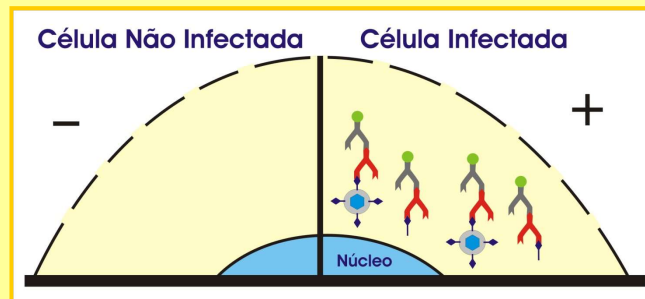
Imunofluorescência Indireta



Diagnóstico Laboratorial de vírus

Imunofluorescência Indireta

• Leitura



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

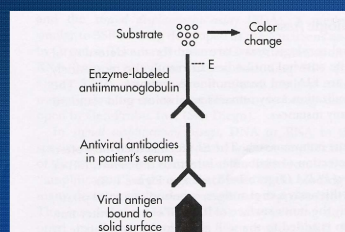


Figure 1.15 Indirect enzyme immunoassay (EIA). E, Enzyme.

Diagnóstico Laboratorial de vírus

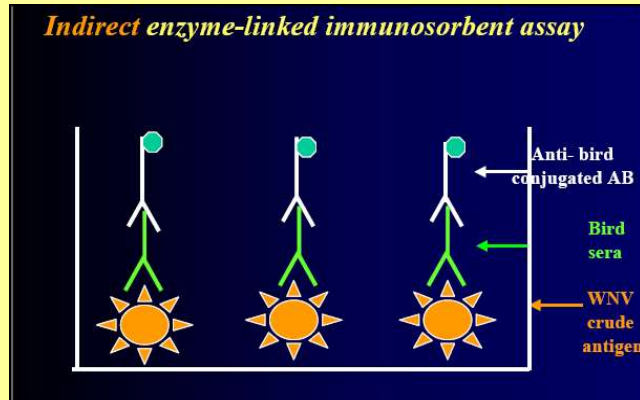
ELISA

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

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



Indirect enzyme-linked immunosorbent assay



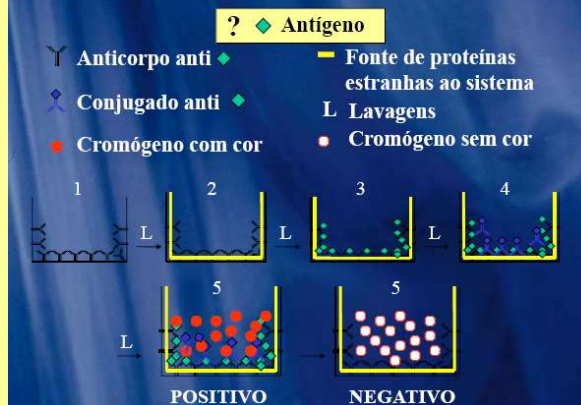
Diagnóstico Laboratorial de vírus

ELISA

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

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

ELISA DIRETO COM ANTICORPO DE CAPTURA



Diagnóstico Laboratorial de vírus

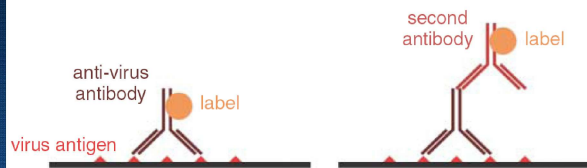
ELISA



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

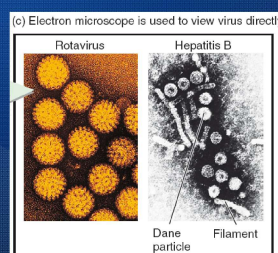
Ex: exame de fezes de pacientes com gastroenterites por rotavírus

- 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 nucleicos específicos virais

. Vantagens

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

- 2 categorias principais

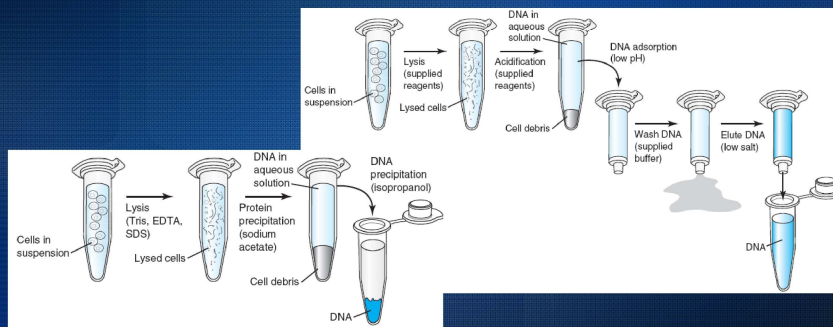
- . Hibridização direta
- . Amplificação de um alvo específico

Extração de ácidos nucleicos

- Isolamento do DNA ou RNA total de uma amostra

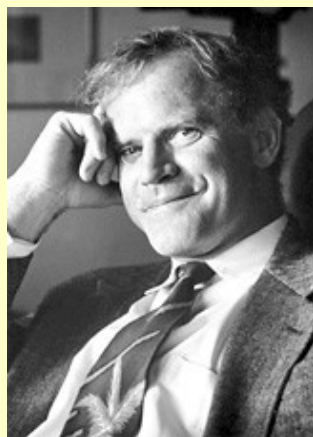
Ex: DNA humano + DNA viral + DNA bacteriano

- Existem diferentes metodologias para extração



Diagnóstico Laboratorial de vírus

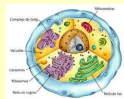
PCR – *POLYMERASE CHAIN REACTION* (Reação em cadeia da DNA polimerase)



Kary B. Mullis
Prêmio Nobel de Química (1993)

Diagnóstico Laboratorial de vírus

Comparando as Reações



In vivo- Célula

**Helicase
Primase
DNA polimerase
MgCL₂
Tampão
dNTP**

In vitro- Microtubo



**Desnaturação
Primers
Ampli TAQ DNA polimerase
MgCL₂
Tampão
dNTP**

Bactérias com potencial biotecnológico

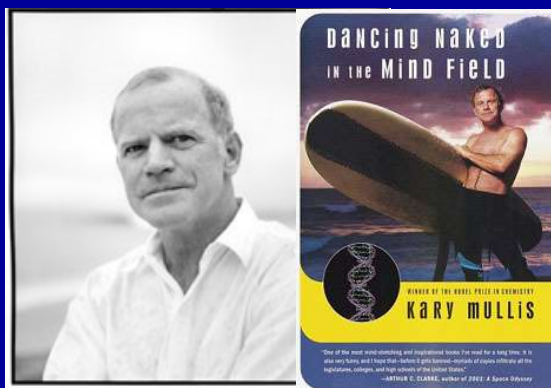
Produzem Enzimas específicas - Exemplo: *Thermus aquaticus*



Fontes Termais

Diagnóstico Laboratorial de vírus

Inventor da PCR



Kary B. Mullis - Antes

Kary B. Mullis- Depois

www.karymullis.com

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^{++})



PCR

(Polymerase chain reaction)

Desnaturação (95 °C)

Anelamento (50-65 °C)

Extensão (72 °C)

TERMOCICLADORES

Cópias de DNA

Ciclos da PCR

PCR

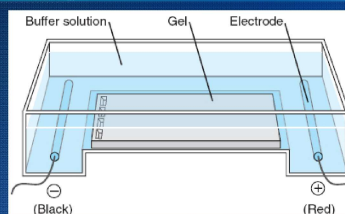
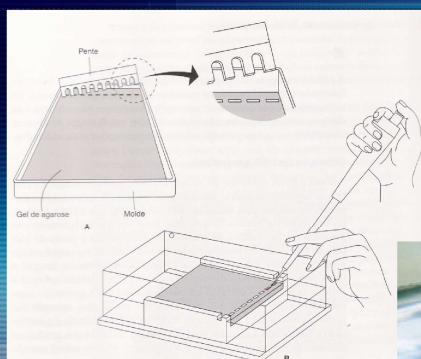
Table 7.2 Elements of a PCR Cycle

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

ONE CYCLE

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

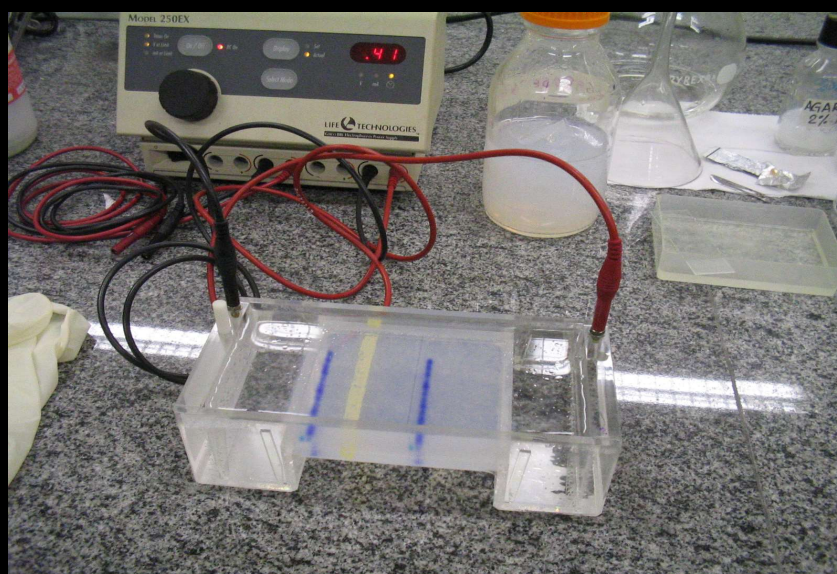
Corrida em gel de agarose



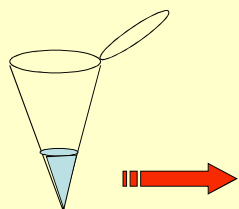
Detecção do produto

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

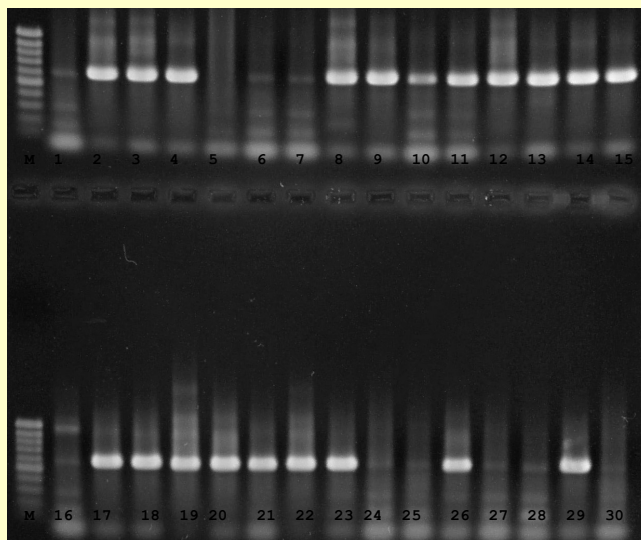
Gel de Agarose



Diagnóstico Laboratorial de vírus

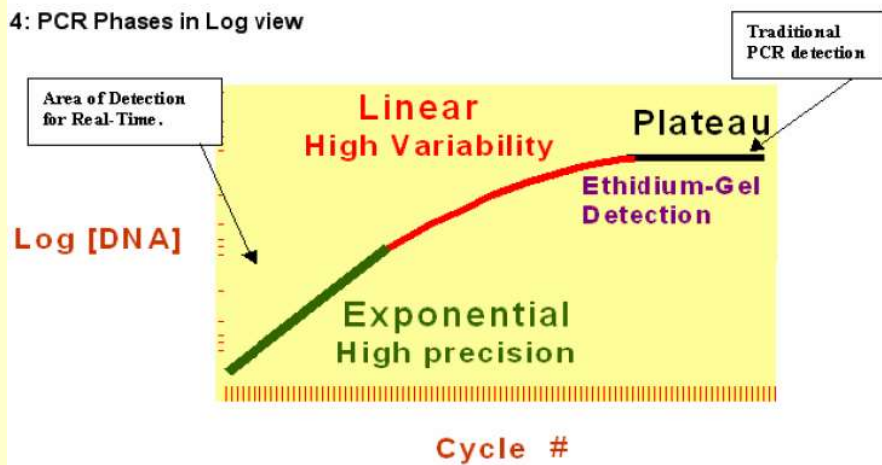


Gel de Agarose



Diagnóstico Laboratorial de vírus

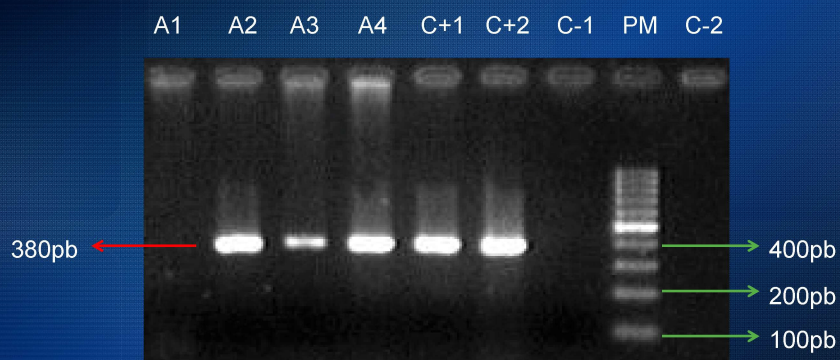
4: PCR Phases in Log view



PCR – Exemplo Resultado

PCR RSV

Valor esperado: 380pb

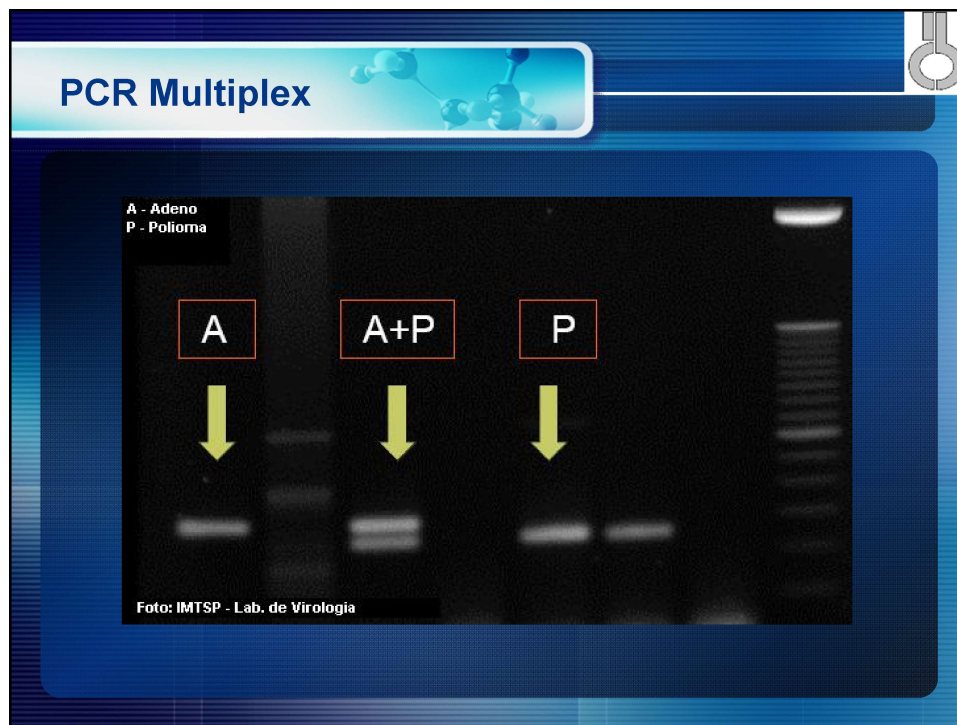


PCR Multiplex

- Simultaneamente, com alvos de DNA de diferentes vírus

- Requerimentos

1. Cada par de primers requer condições ótimas específicas, sendo necessário que estas condições sejam próximas no multiplex
2. Produtos gerados devem ter tamanhos diferenciados
3. Não deve ocorrer associações entre os diferentes pares de primers



Diagnóstico Laboratorial de vírus

Tipos de PCR em tempo real

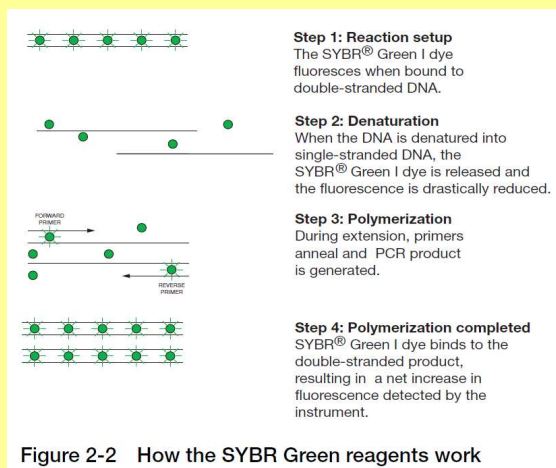
- Sem sonda (SYBR Green)
- Com sonda (Taqman, Molecular Beacons, outras)

Sybr Green

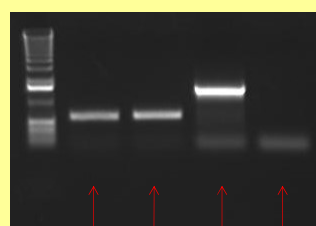
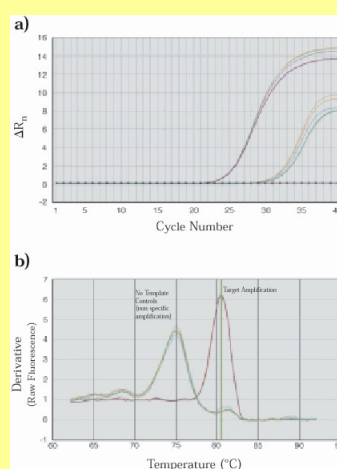
- Material Fluorescente
- Intercalante de DNA Fita dupla
- Permite fazer curva de dissociação

Diagnóstico Laboratorial de vírus

Método SYBR Green



Detecção de primer dimer através da análise da curva de fusão



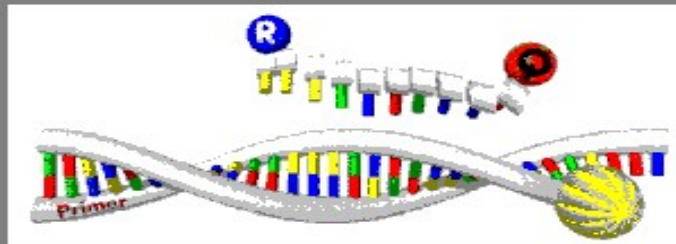
Reações otimizadas Reações Não-otimizadas

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

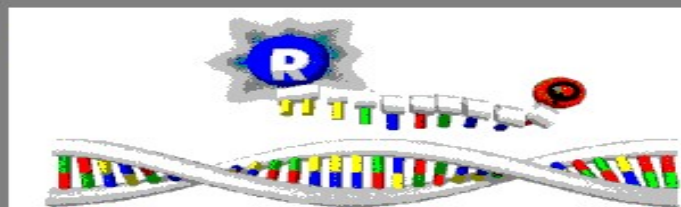
Sonda- TaqMan

- 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

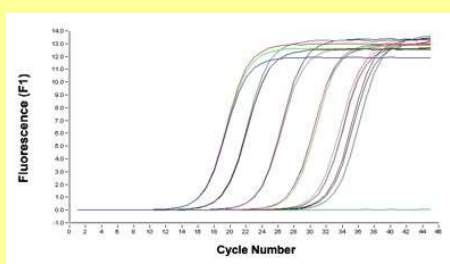
PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR)

- 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

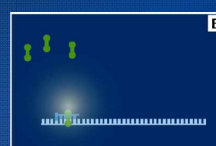
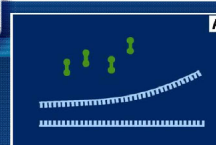
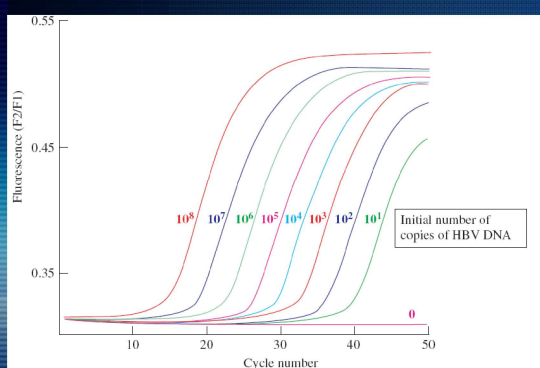
PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR)

- 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

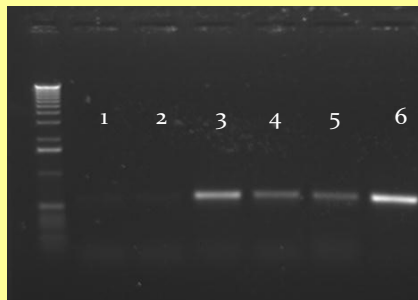


PCR Quantitativo – Real Time

PCR REAL TIME



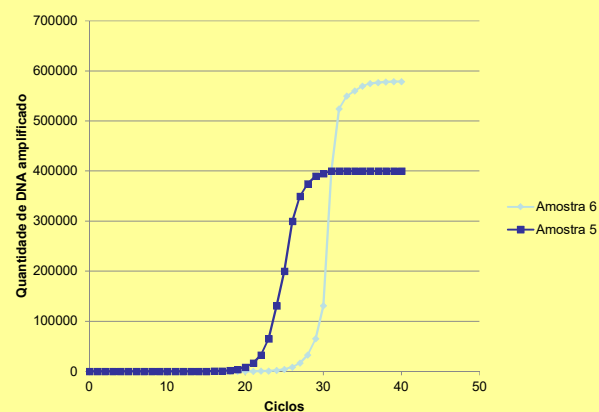
RT-PCR para detecção do vírus X



Qual amostra tem maior quantidade do vírus Patogênico?

Diagnóstico Laboratorial de vírus

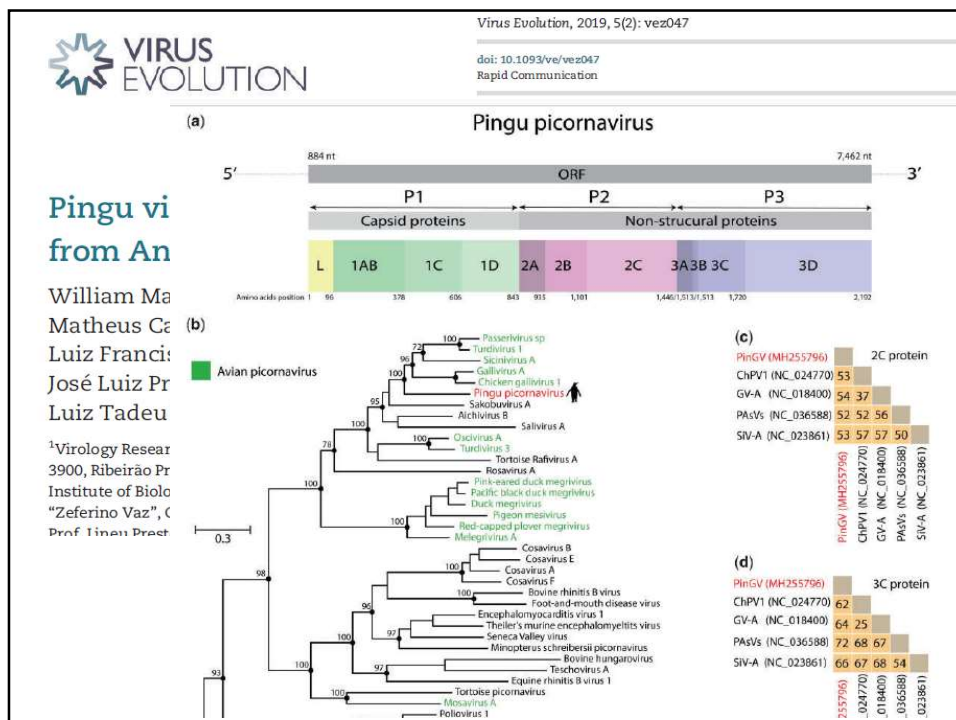
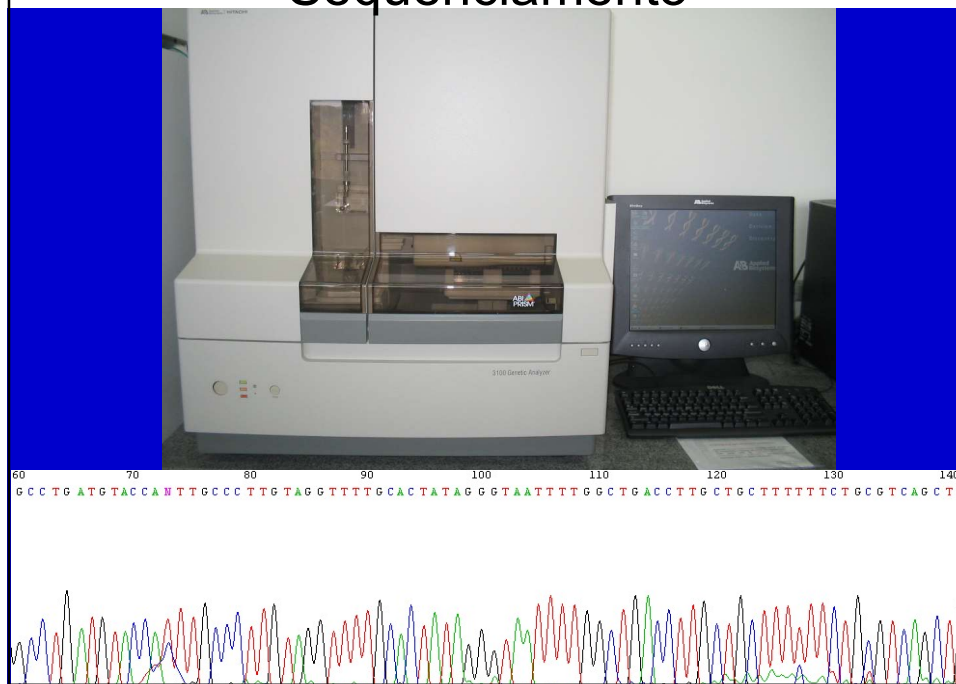
RT-PCR para detecção do vírus X

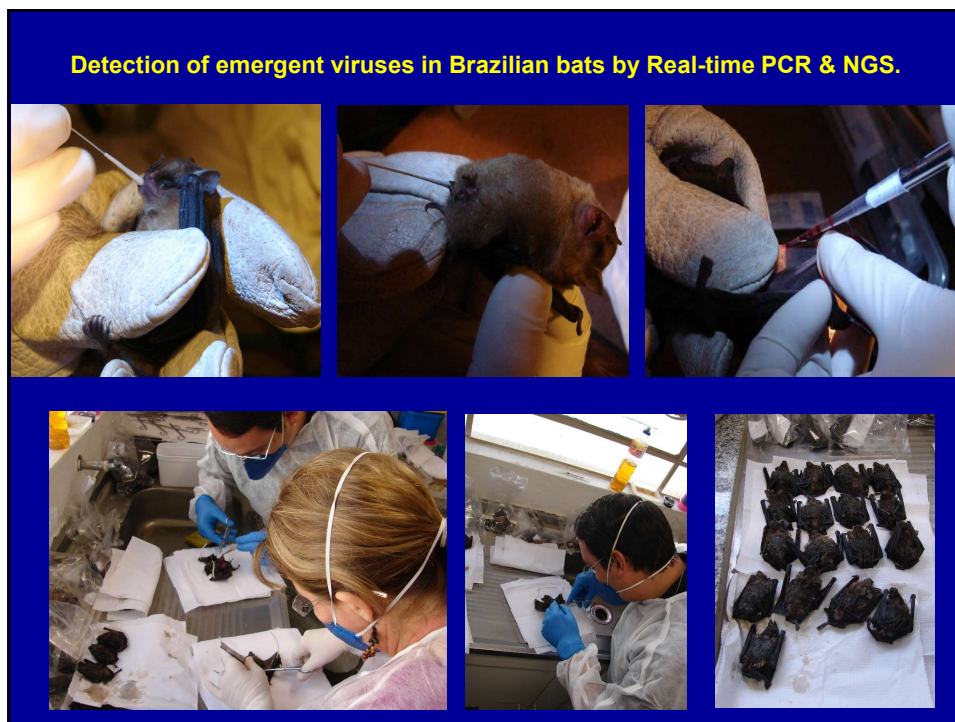


Qual amostra amplificou maior quantidade de DNA?

Qual amostra tem maior quantidade do vírus X?

Sequenciamento





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 18/06/2021

Alphacoronavirus

Betacoronavirus

Gammacoronavirus

Deltacoronavirus

Hantavirus em casos Humanos no Brasil

Journal of Medical Virology

Co-Circulation in a Single Biome of the Juquitiba and Araraquara Hantavirus Detected in Human Sera in a Sub-Tropical Region of Brazil

Jansen de Araújo,^{1*} Ana L.L. Duré,² Raquel Negrão,¹ Tatiana Ometto,¹ Luciano M. Thomazelli,¹ and Edison Luiz Durigon¹

¹BSL3 Clinical and Molecular Virology Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil
²Division of Epidemiologic and Disease Control, Octávio Magalhães Institute- LACEN/ MG, Esquiel Dias Foundation (FUNED), Minas Gerais Health Department, Belo Horizonte, Brazil

Hantaviruses is an emerging infectious disease. Although HCPS has been reported in several regions of Brazil, more cases of HCPS have recently been reported in Minas Gerais

occur. Virus transmission takes place via the inhalation of aerosols from urine or excreta or through direct physical contact with infected animals [Figueiredo et al. 2010]. These viruses can be life threat-

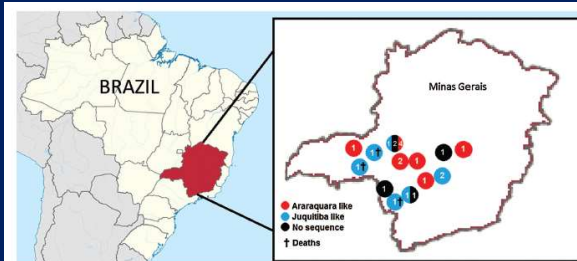


Fig. 1. Confirmed cases of hantavirus from Minas Gerais State. Circled regions on the map represent the locations where the presence of hantavirus in the serum of patients with suspected infection was confirmed using real-time RT-PCR. Blue circles show the JUQV cases, and red circles show the ARAV cases. The dead are represented by (†) inside circles.

Referências

- Trabulsi, L.R., Alterthum, F. MICROBIOLOGIA, 2024. 7ª 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 Hatzioannou](#), [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.

Obrigado pela atenção!

E-mail: jansentequila@usp.br