



# 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

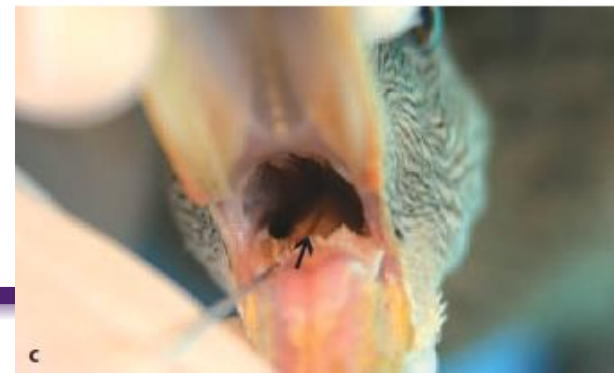
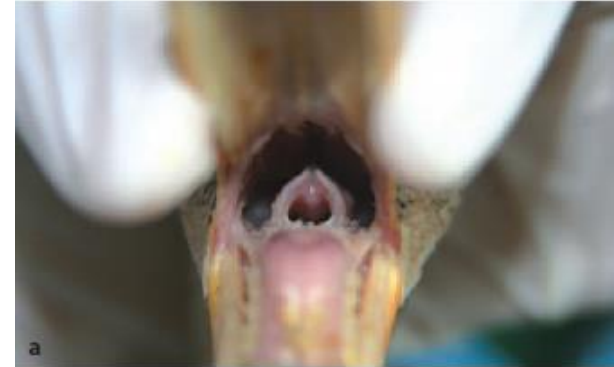


# Coleta de material

- Processamento do sangue
  - Plasma
  - Soro



# Coleta de material- Suabes





# Coleta de material

## ○ Suabes cloacais



# Coleta de material

## ○ Suabes



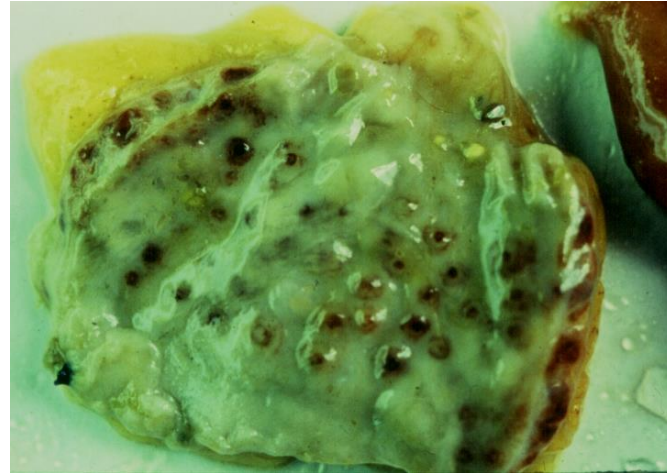
# NECROPSIA



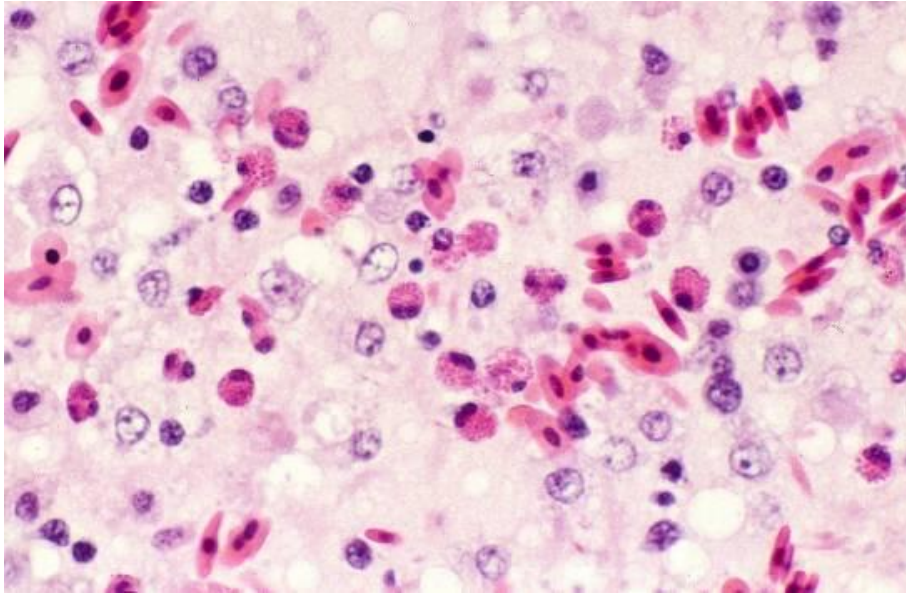
<http://partnersah.vet.cornell.edu/veterinarians/avian-necropsy-examination>



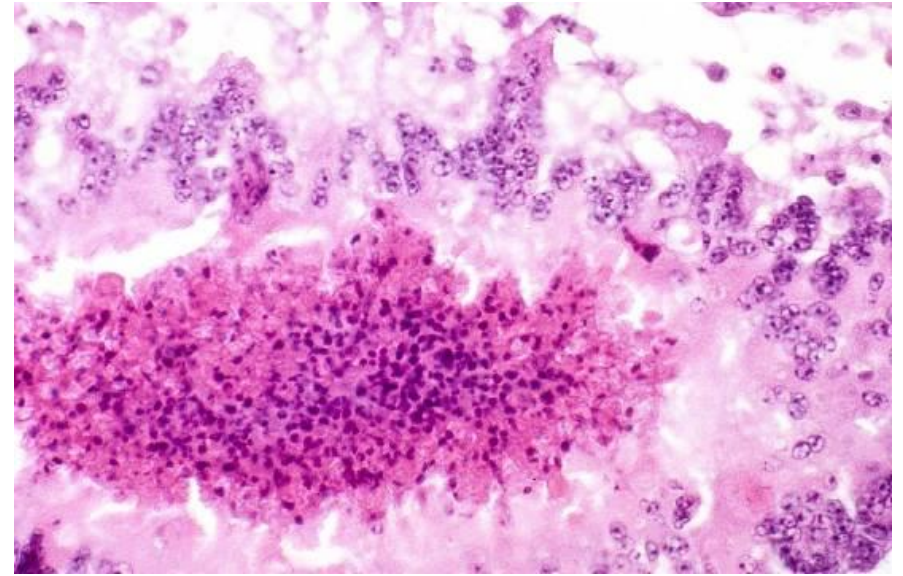
# LESÕES MACROSCÓPICAS



# HISTOPATOLOGIA

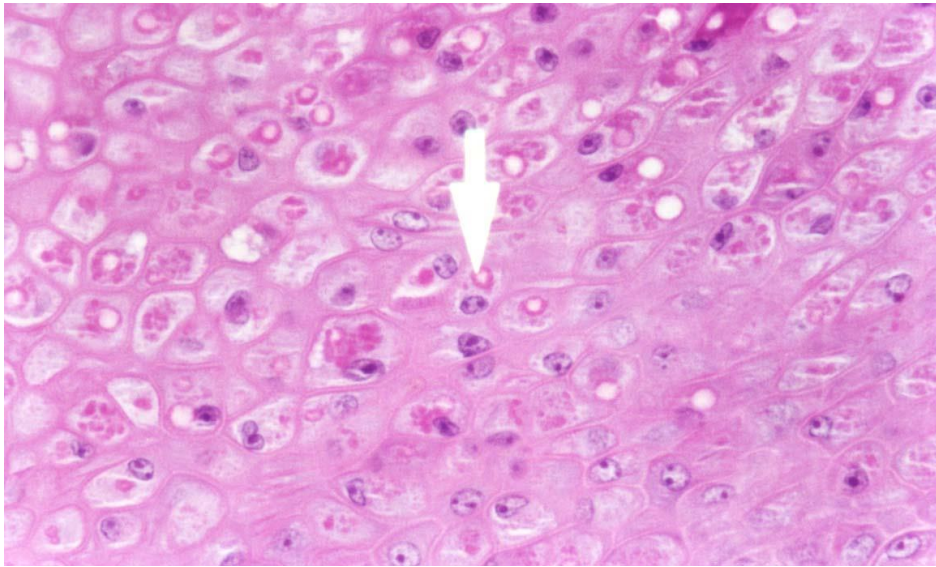


Infiltrado Heterofílico

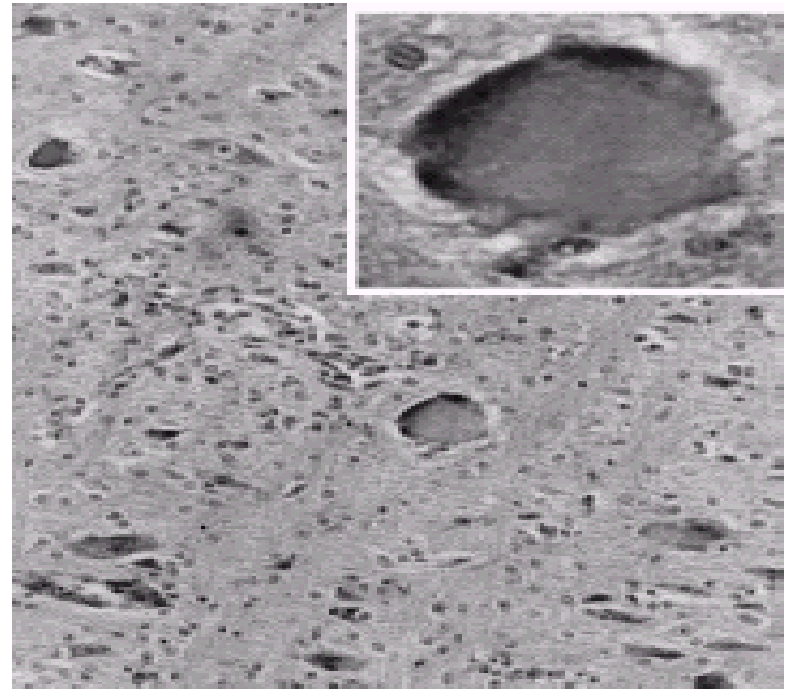


Granuloma

# HISTOPATOLOGIA



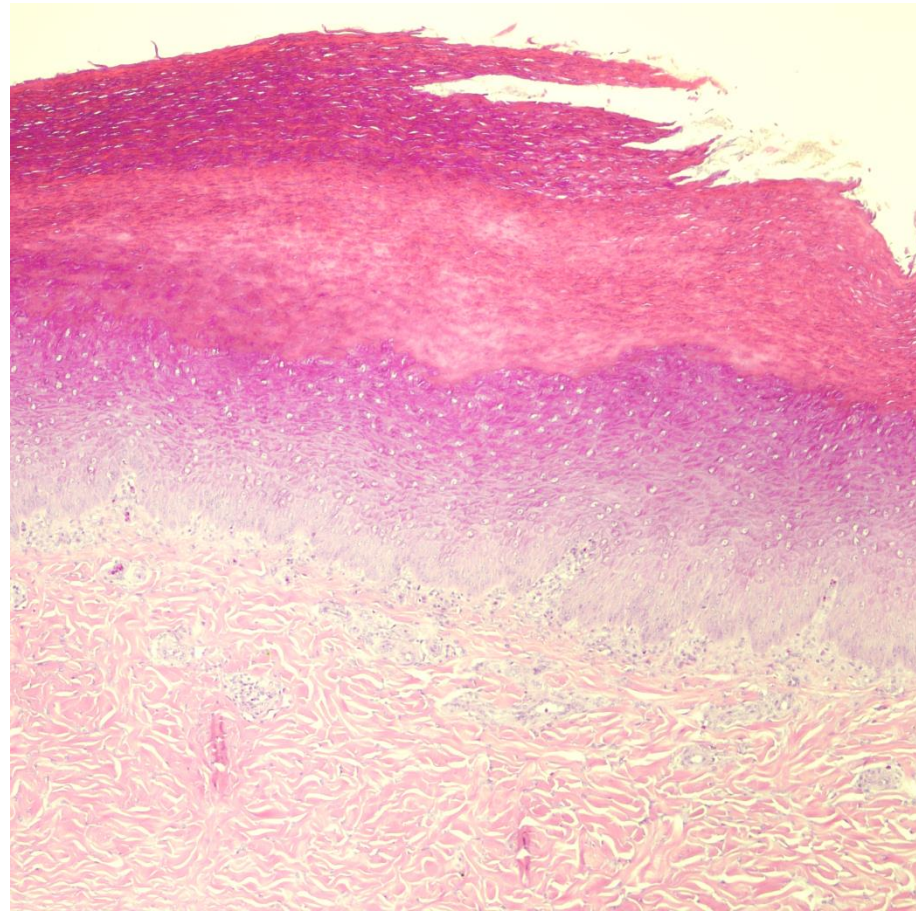
Bouba Aviária



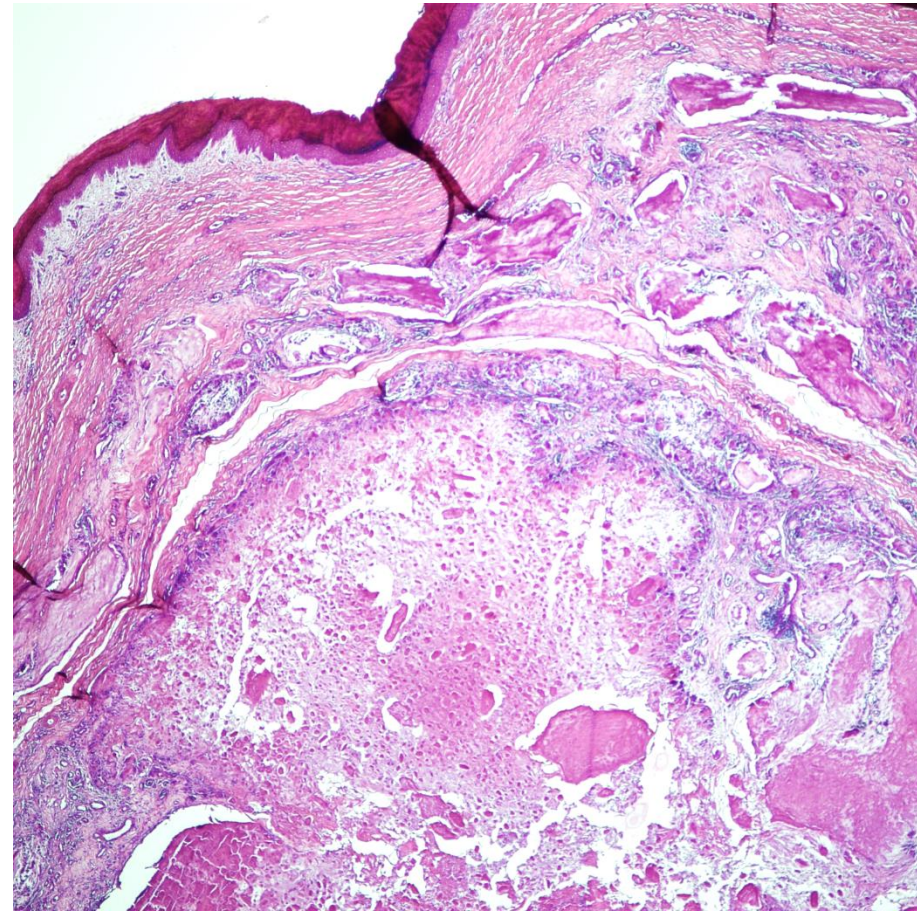
Encefalomielite Aviária



# HISTOPATOLOGIA



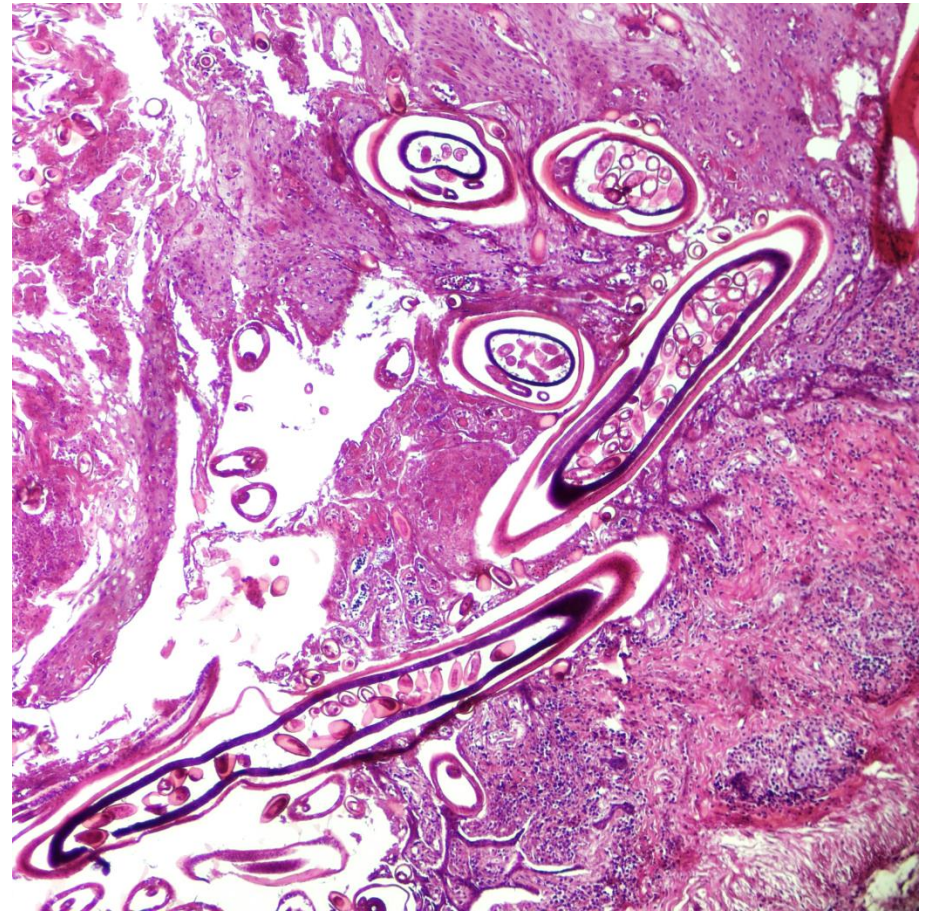
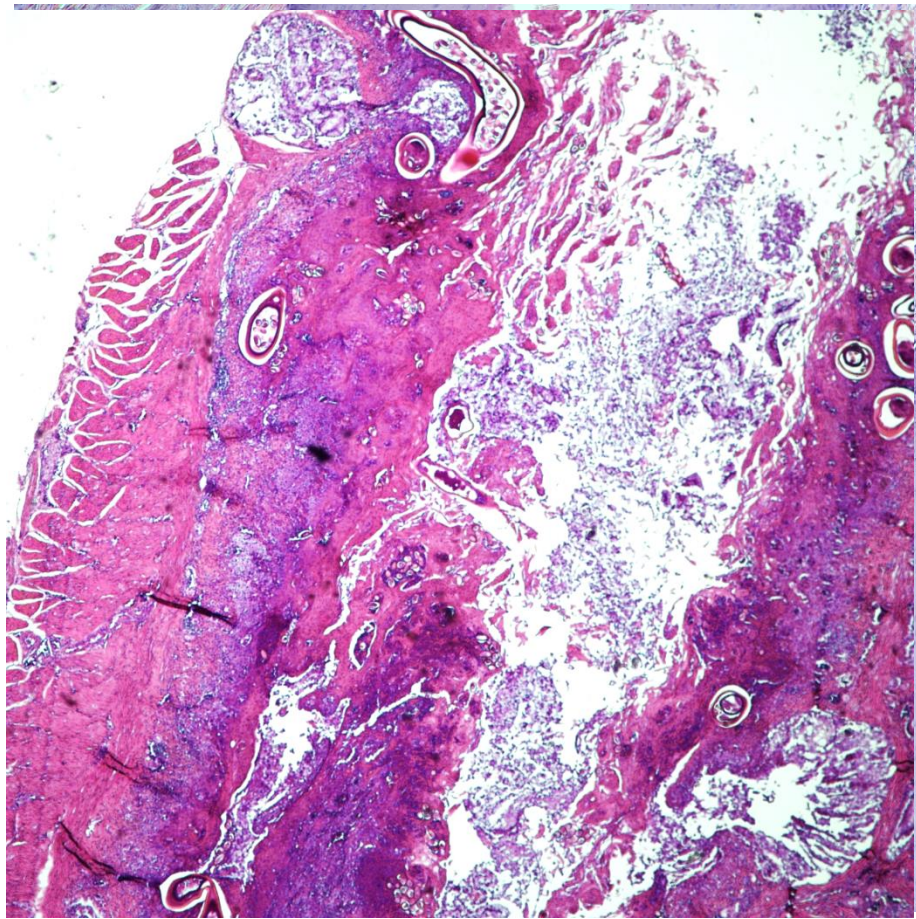
Pele normal



Gota



# HISTOPATOLOGIA



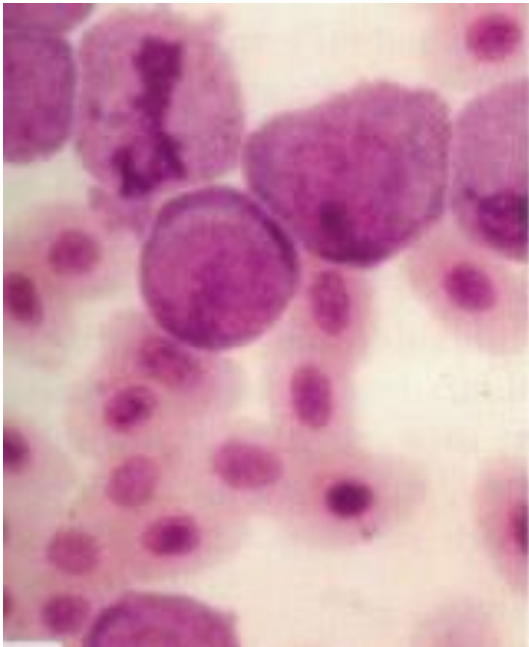
Papo- Capilaria

# EXAMES LABORATORIAIS

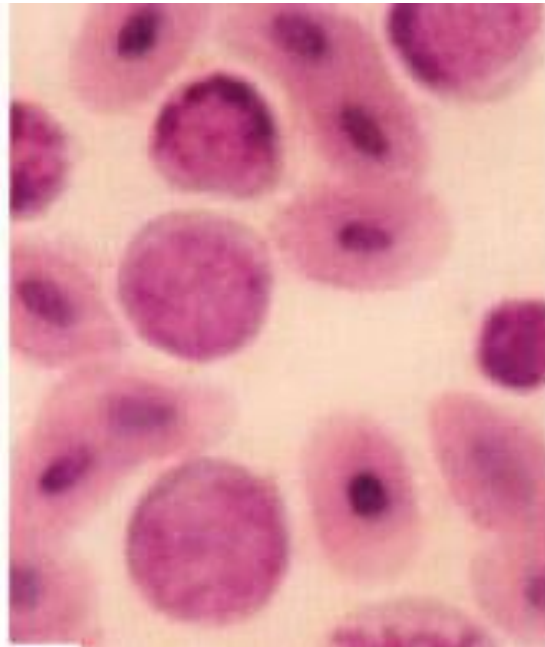
- Exames sorológicos
- Hematologia / Bioquímica sérica
- Isolamento e identificação de vírus/bactérias/fungos
- Isolamento / Pesquisa de Protozoários
- Pesquisa de endo/ectoparasitos
- Exame histopatológico / Citológico
- Microscopia eletrônica
- Detecção de antígenos
- Detecção de toxinas
- Amplificação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



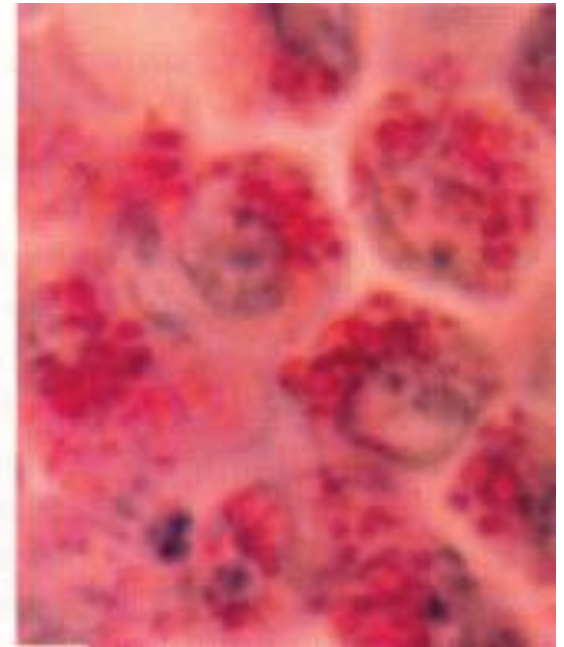
# CITOLOGIA



Eritroblastose

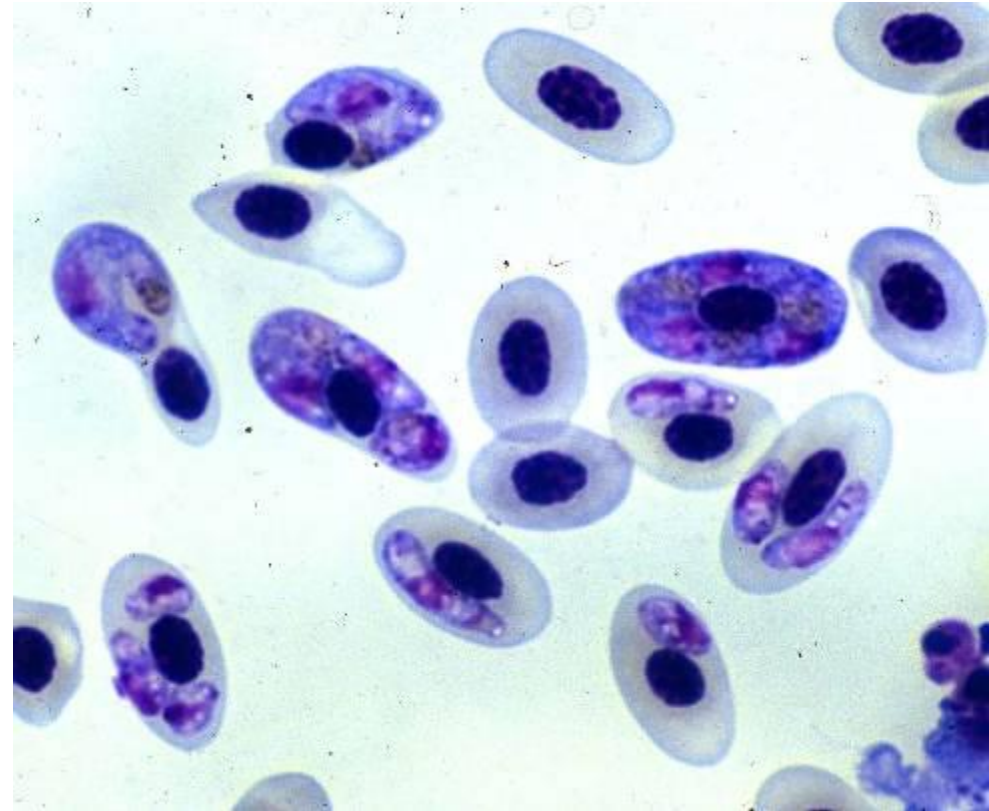


Mieloblastose



Mielocitomatose

# CITOLOGIA



*Haemoproteus columbae*

# PREPARO DO INÓCULO



# DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

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

# 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

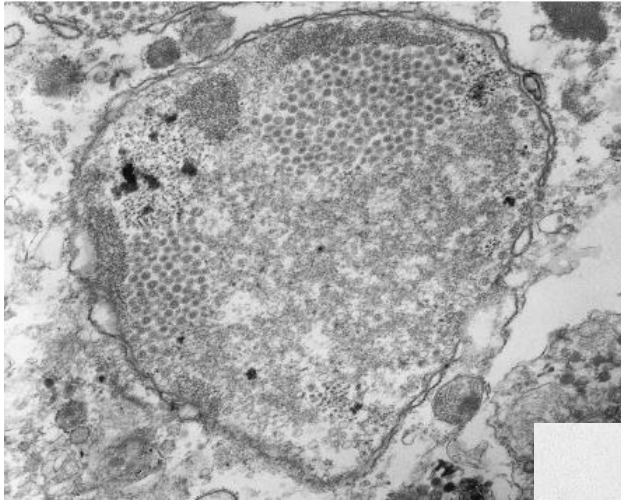
## 4. Detecção do genoma

Hibridização com sondas

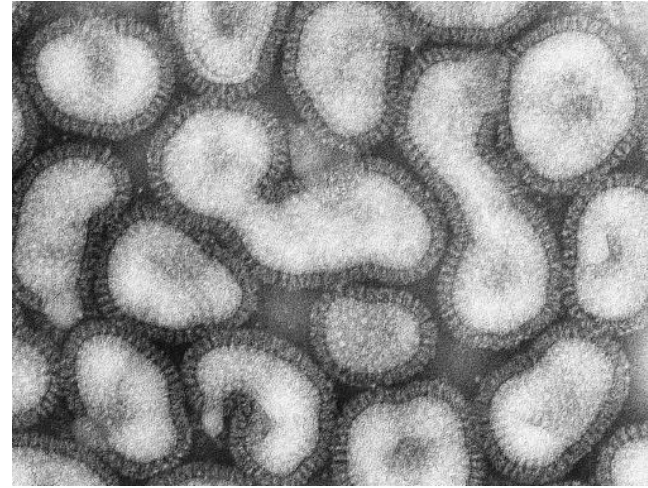
específicas de ácidos nucleicos PCR, RT-PCR



# MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO



*Herpesvirus 1*



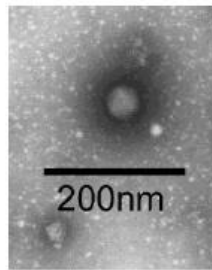
*Influenzavirus A*

*Coronavirus*

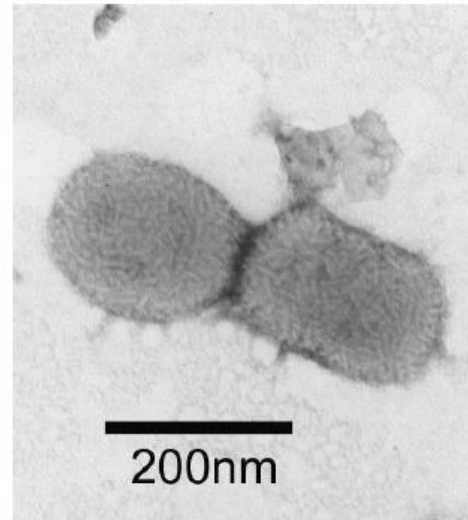


# MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

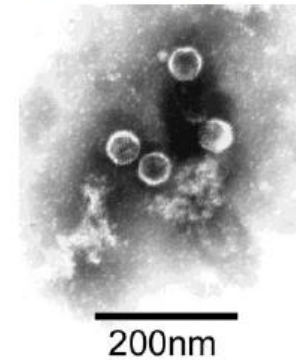
ADENOVIRUS



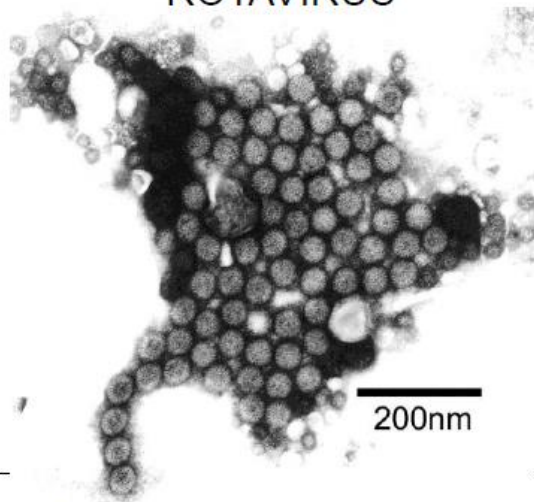
POXVIRUS



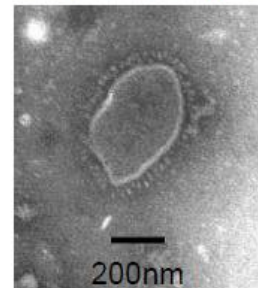
HERPESVIRUS



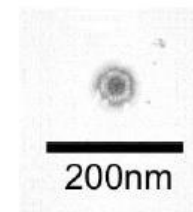
ROTAVIRUS



CORONAVIRUS

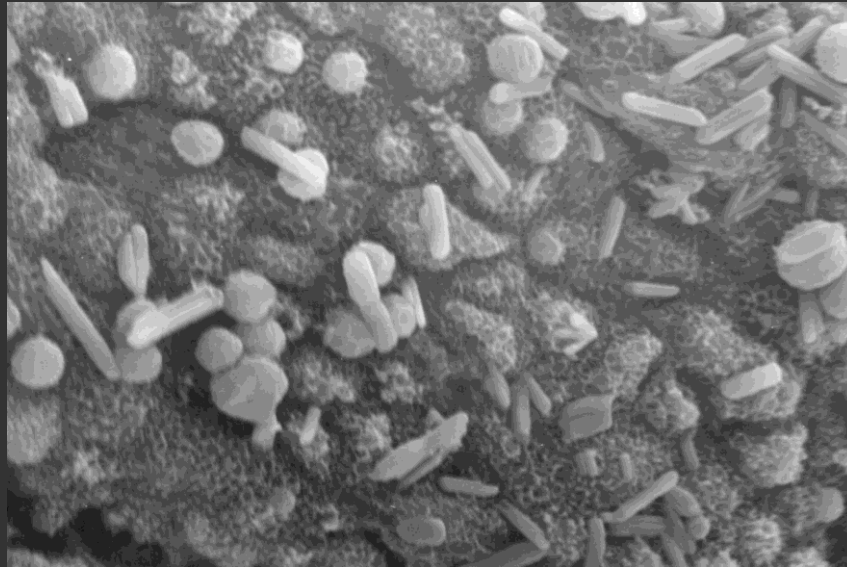


REOVIRUS



Taken by  
Vanessa  
Ceeraz

# MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

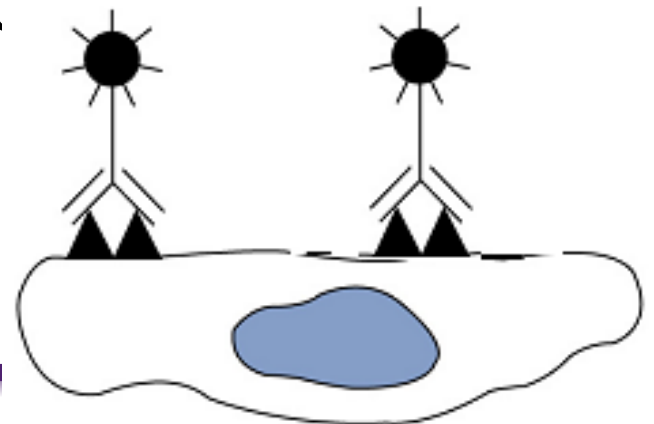


*Traquéia mostrando colonização epitelial por E. coli e C. baileyi com perda severa de cílios. Grupo II, 13 dias de idade, 2000 X.*

# IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

## ○ Direta

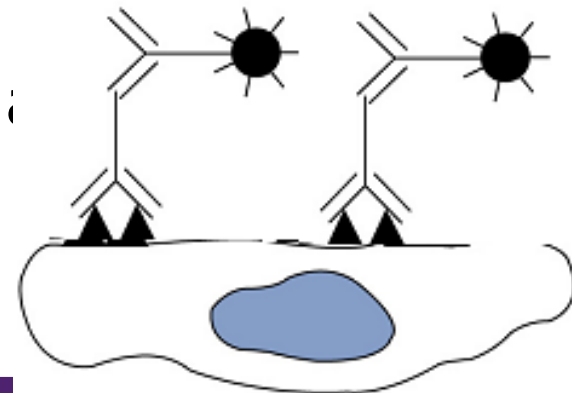
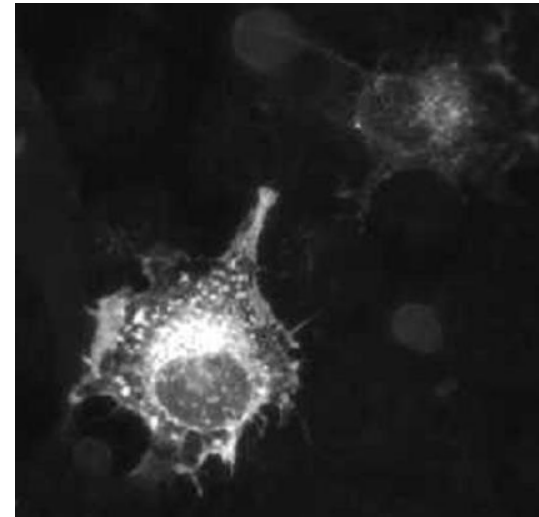
- Anticorpo marcado sobre material infectado
- Material infectado (suspeito)
- Anticorpo específico marcado com Peroxidase
- Luz UV ou luz branca



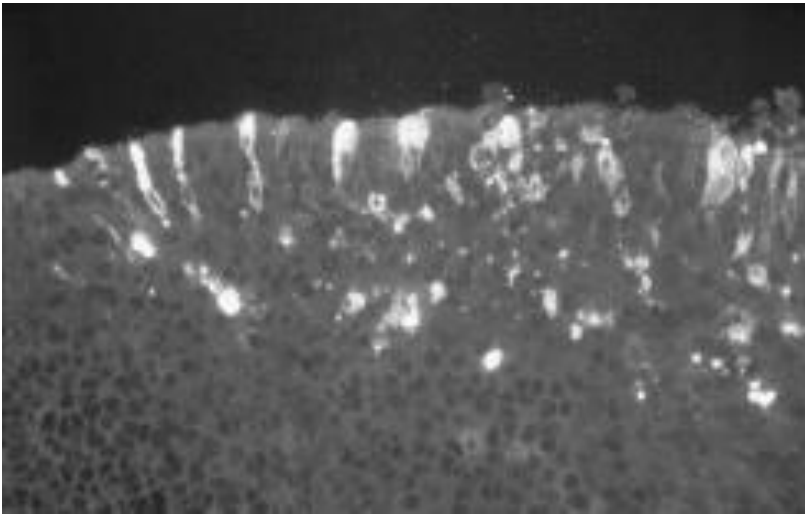
# IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

## ○ Indireta

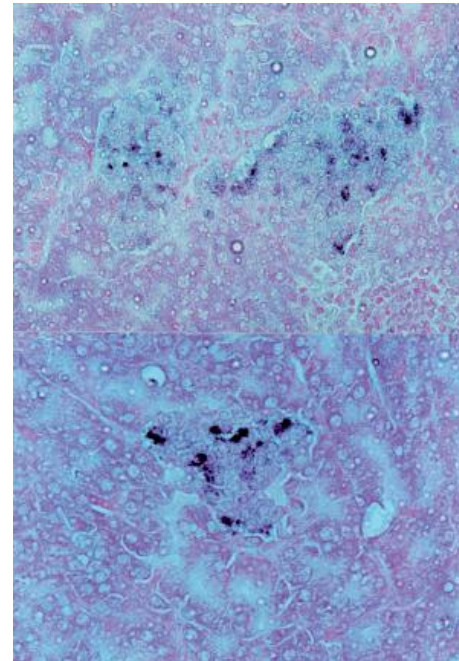
- Utilização de dois anticorpos
- Material infectado (células ou tecidos)
- Soro específico (ex: soro galinha)
- Conjugado anti-IgG específico (ex.:  
ou Peroxidase)
- Luz UV ou Luz branca



# IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA



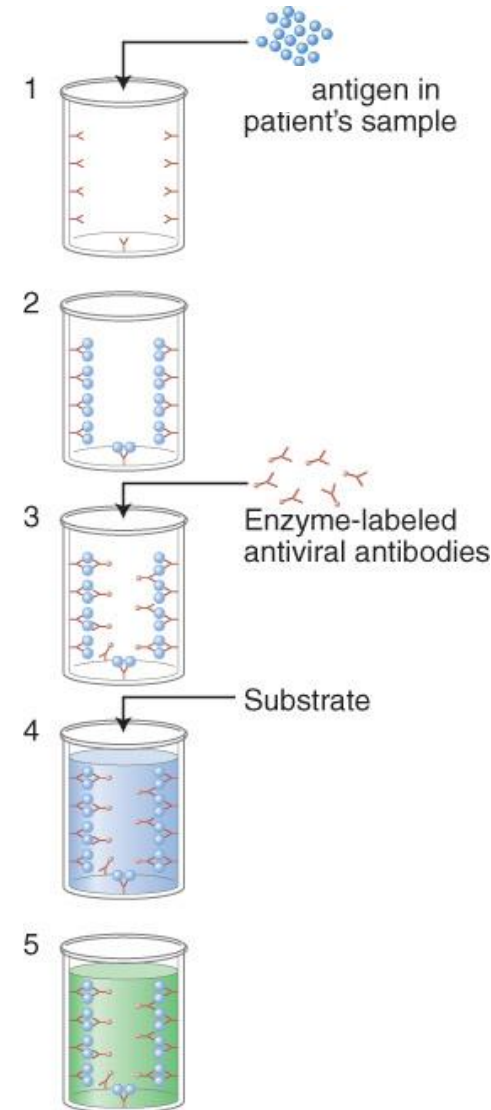
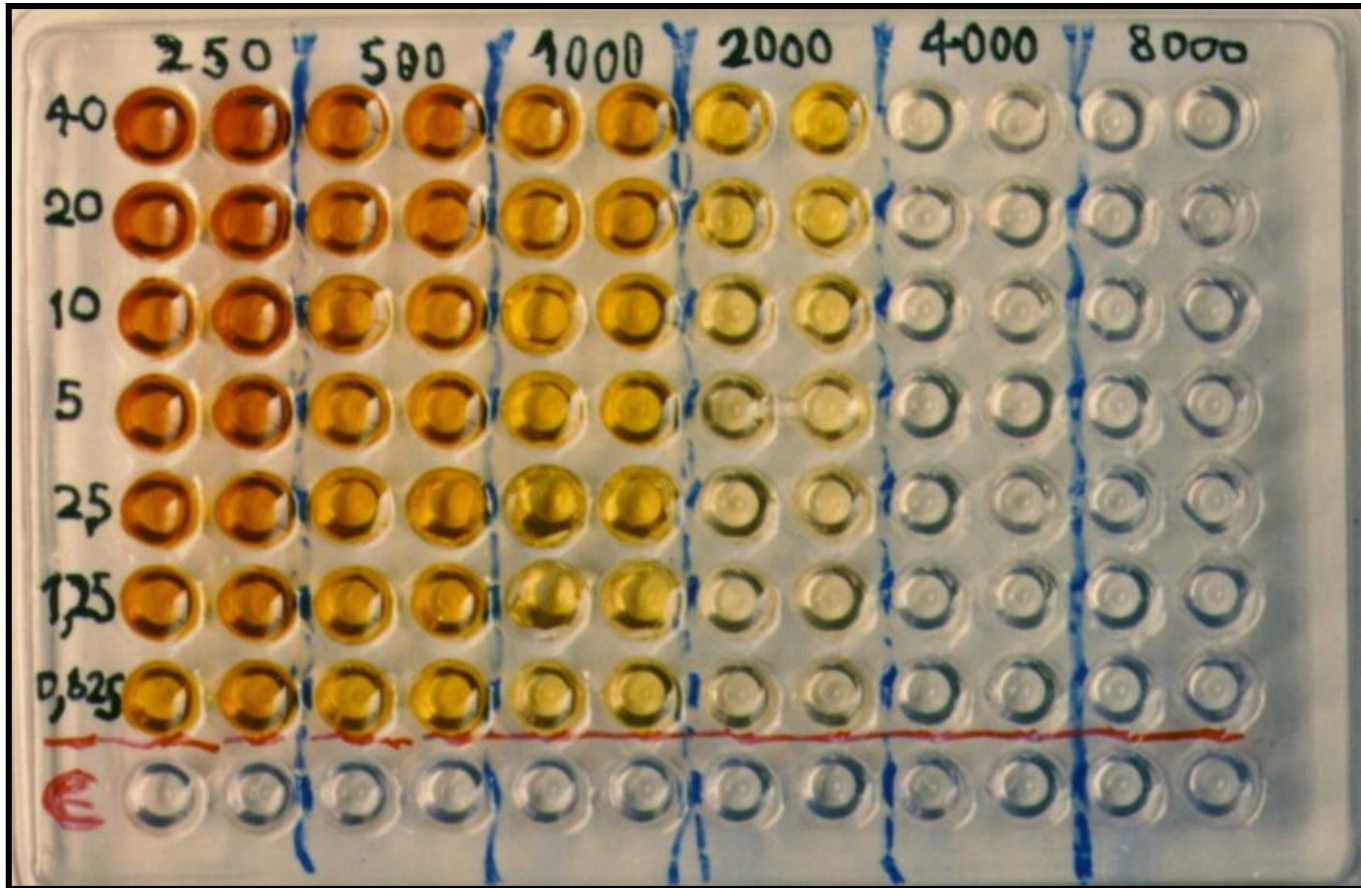
Coronavirus - Intestino



Adenovirus - Pâncreas



# ELISA (DIRETO)





# 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

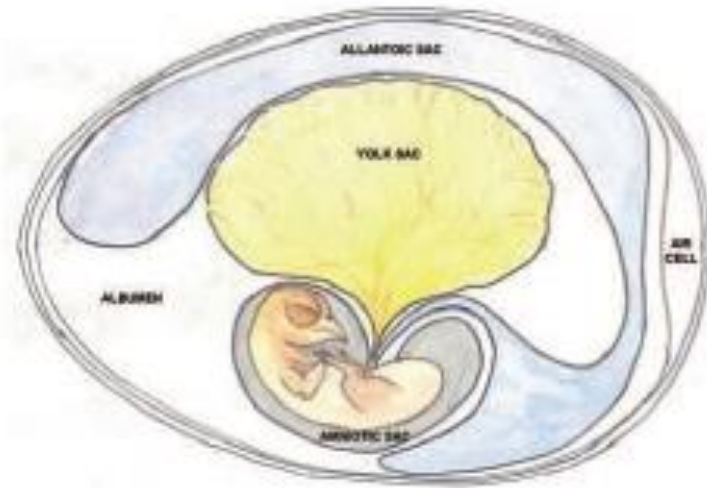
# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



# ISOLAMENTO VIRAL

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

# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



d

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

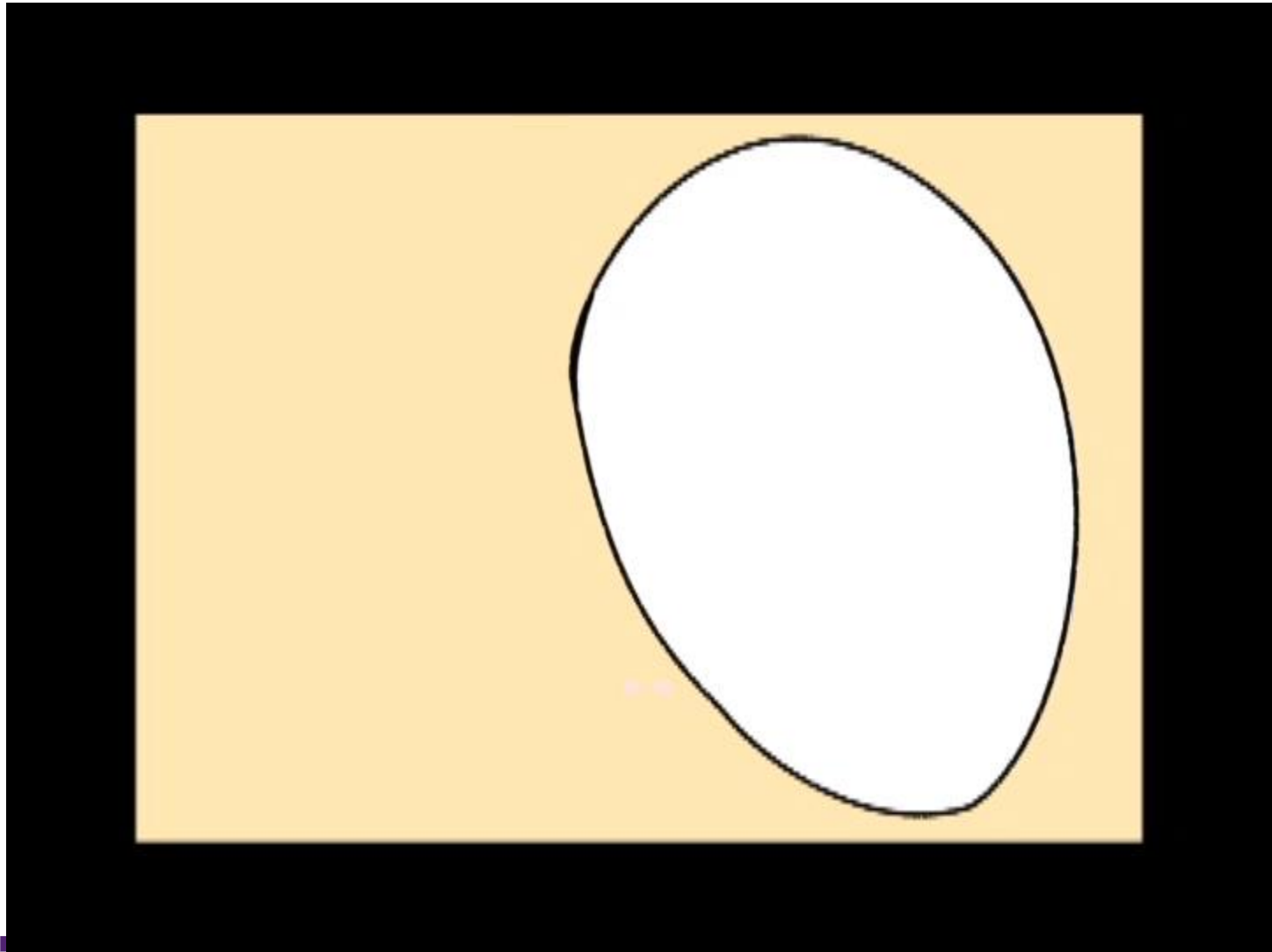
<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=egg-inoculation>

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

# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



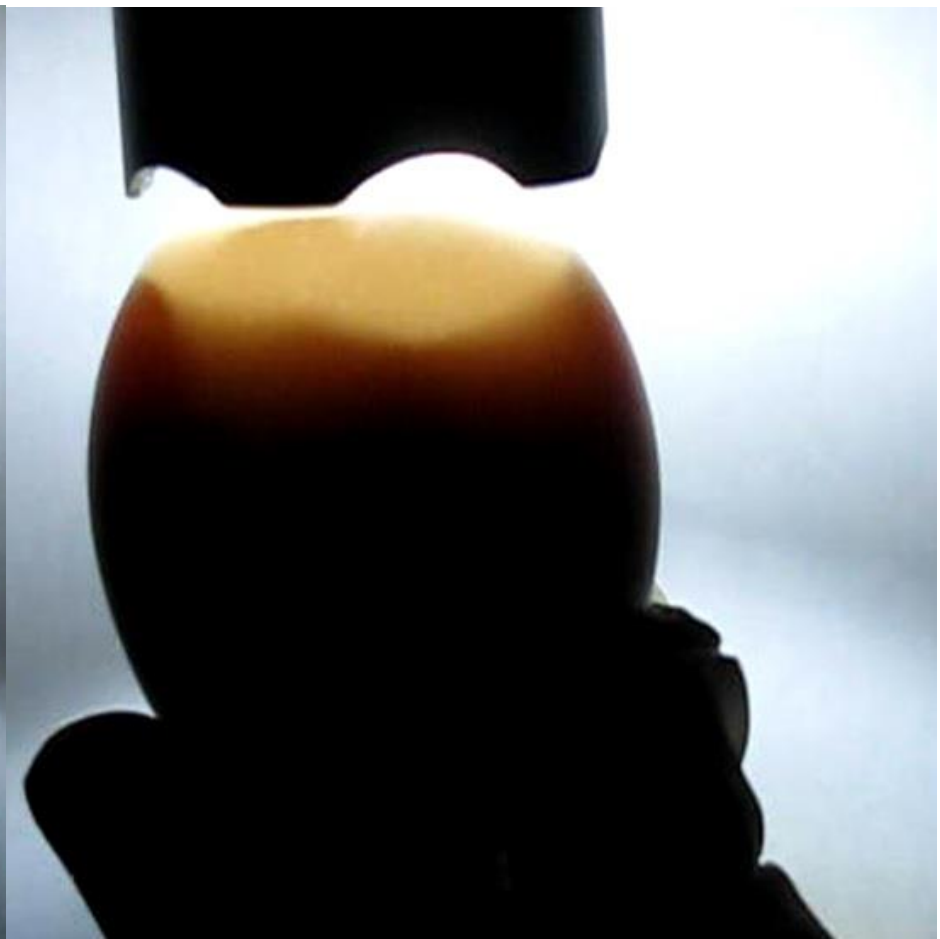
# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS





# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS





# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS

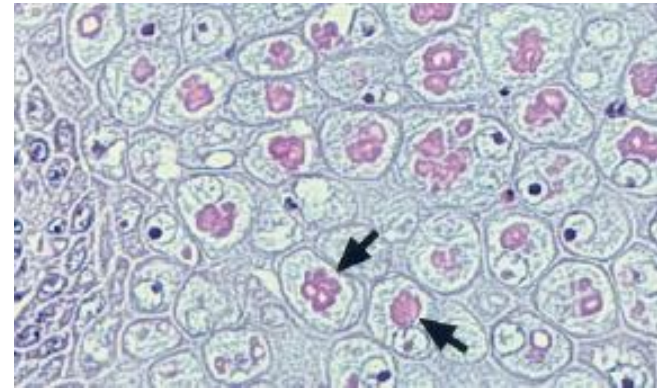
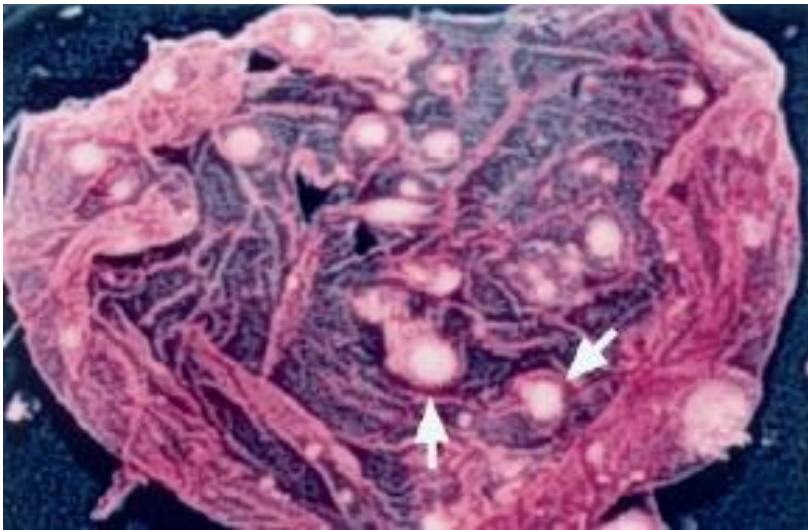


# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



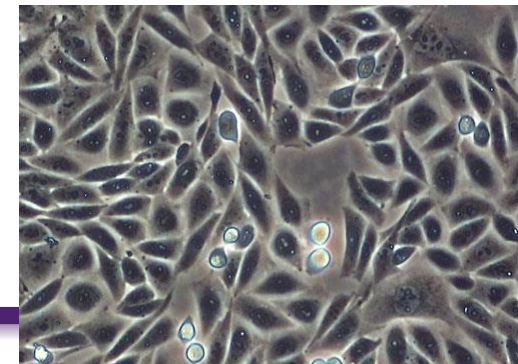
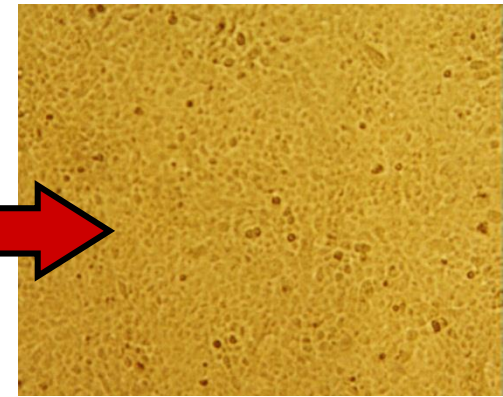


# ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS



Avipoxvirus

# ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR



# ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR

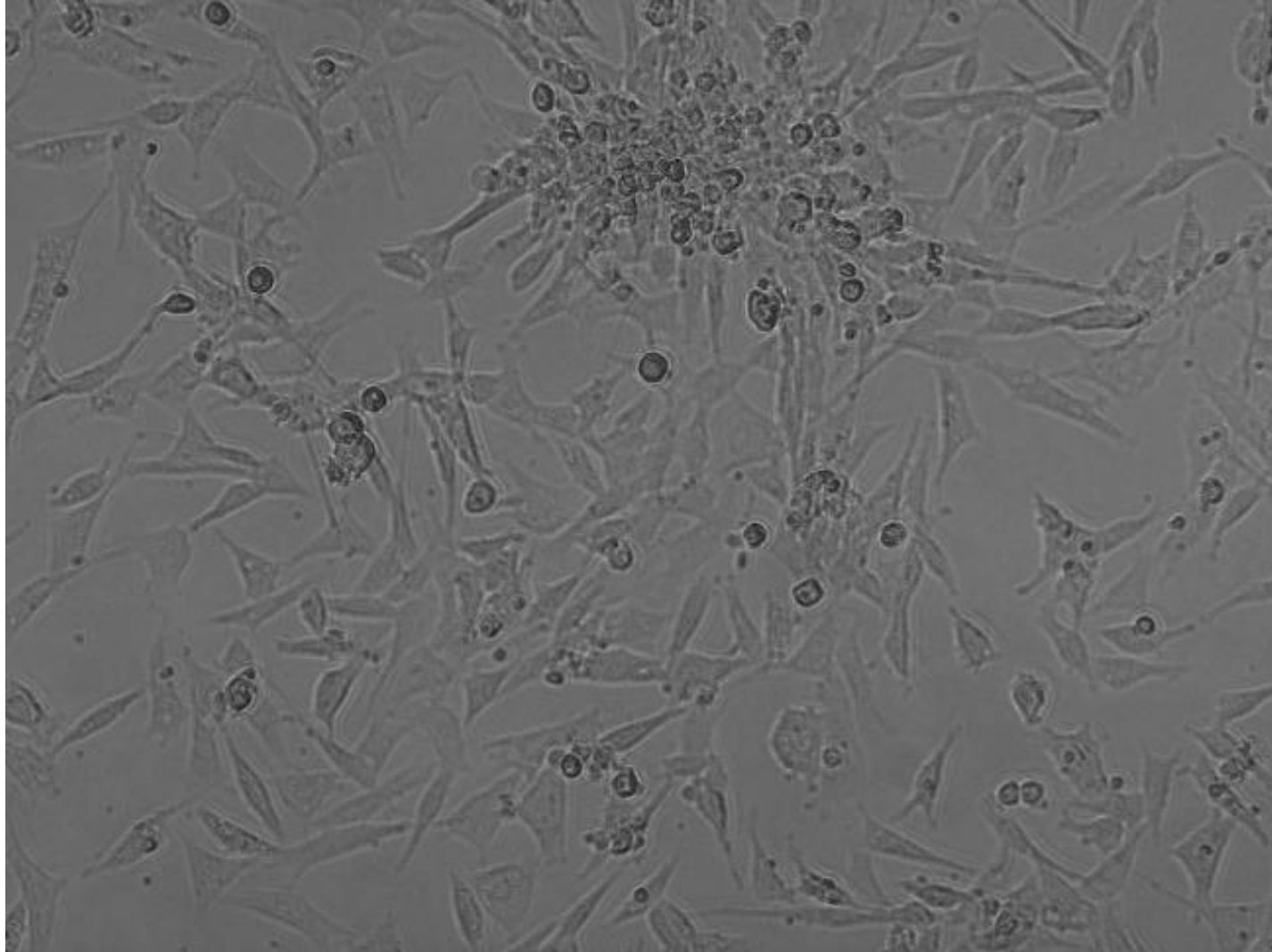
- Cultivos primários (células diplóides)
- Linhas celulares
  - Cultivo semi contínuo
    - Diplóide, 40 passagens
  - Cultivo contínuo
    - Número de passagens indefinido

# 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

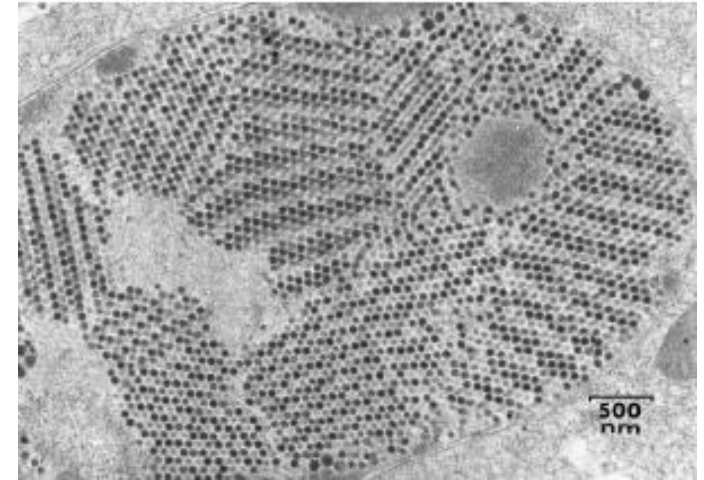


# ISOLAMENTO VIRAL

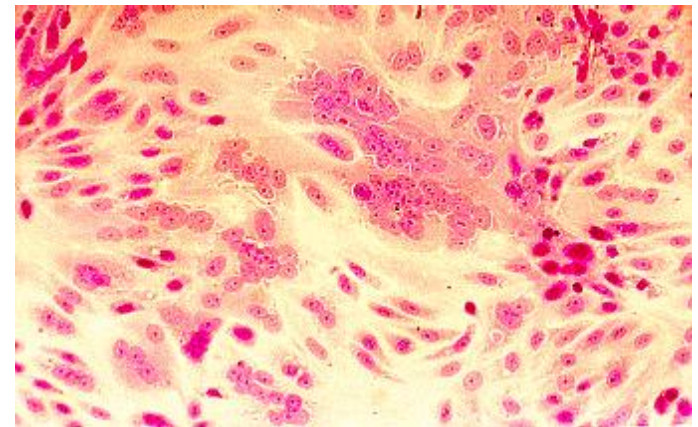




# ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR



Adenovirus – Células de Fígado



Formação de Sincícios

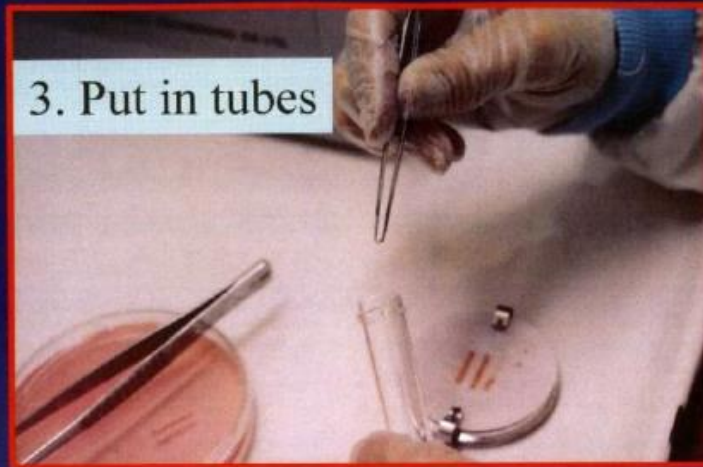
# ISOLAMENTO VIRAL EM ANÉIS DE TRAQUEIA

## Tracheal organ cultures

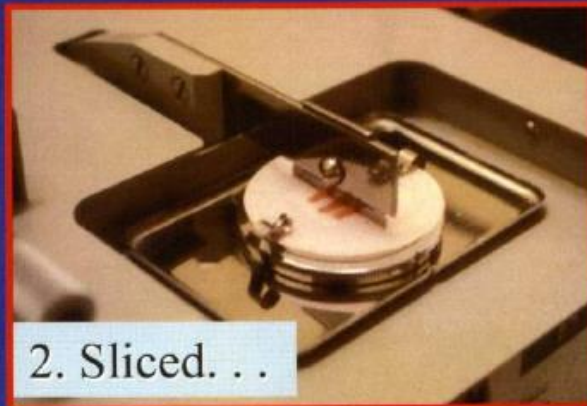
1. Embryo tracheas . . .



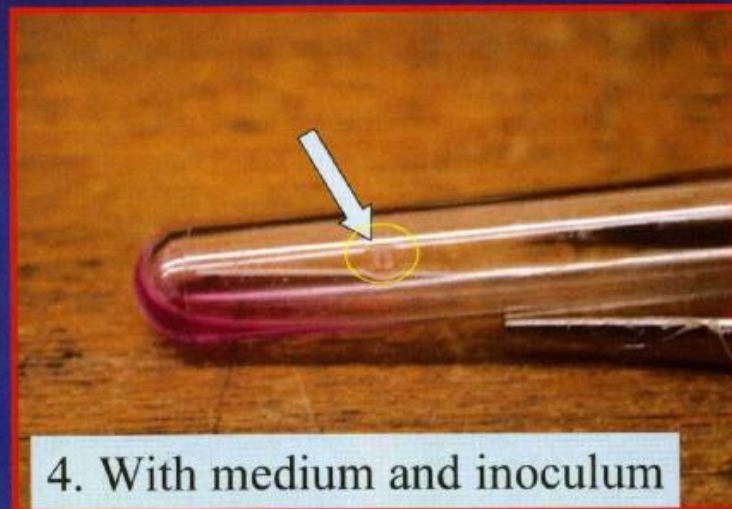
3. Put in tubes



2. Sliced . . .



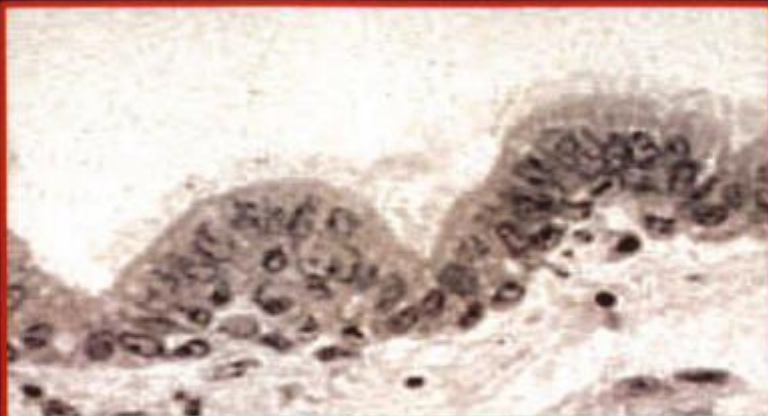
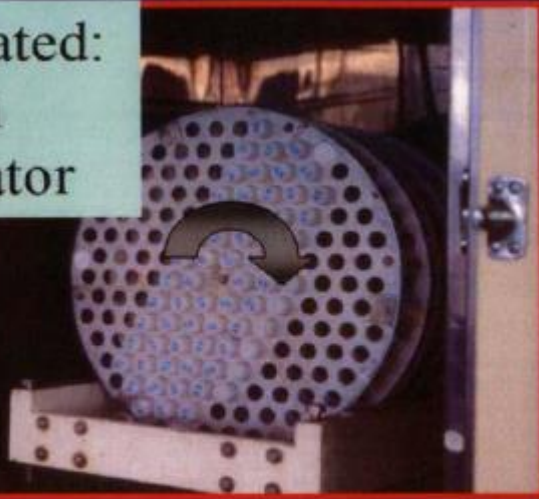
4. With medium and inoculum



Courtesy of R C Jones, Liverpool University.



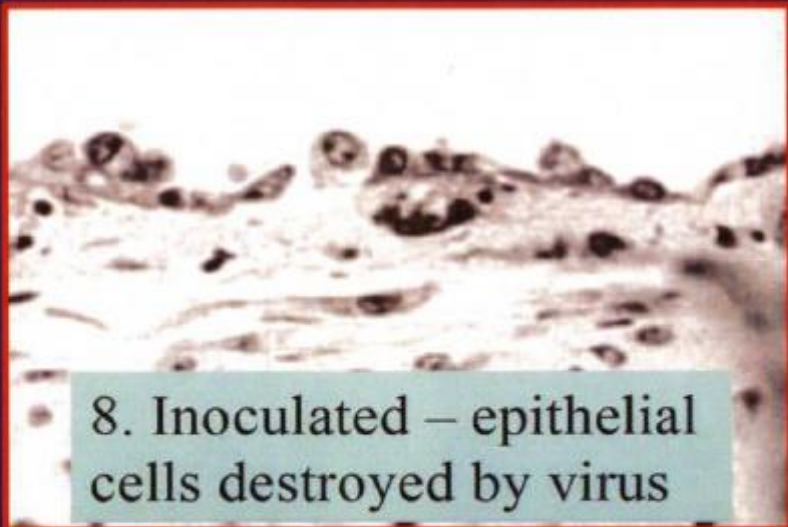
5. Inoculated:  
rotated in  
an incubator



7. Uninoculated – cilia active



6. Examined daily  
for up to 6 or 7 days

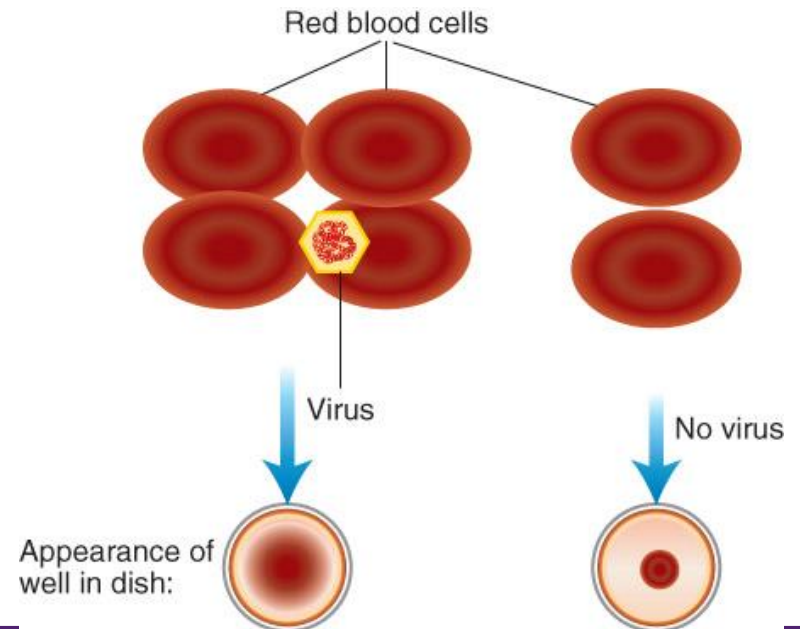


8. Inoculated – epithelial  
cells destroyed by virus

Courtesy of R C Jones, Liverpool University

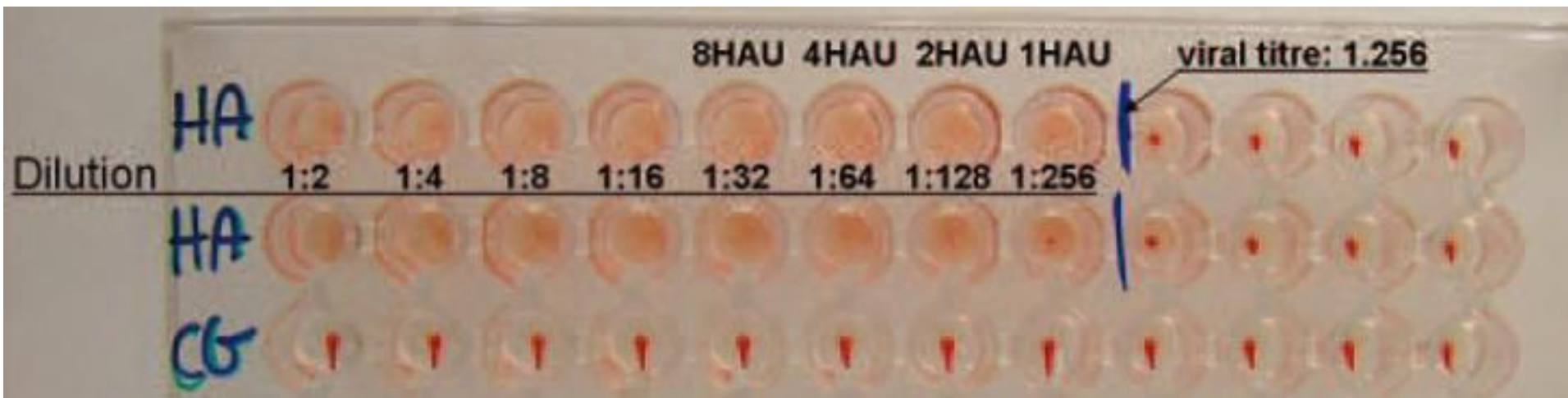
# DETECÇÃO VIRAL

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



# DETECÇÃO VIRAL

## ■ Hemaglutinação (HA)

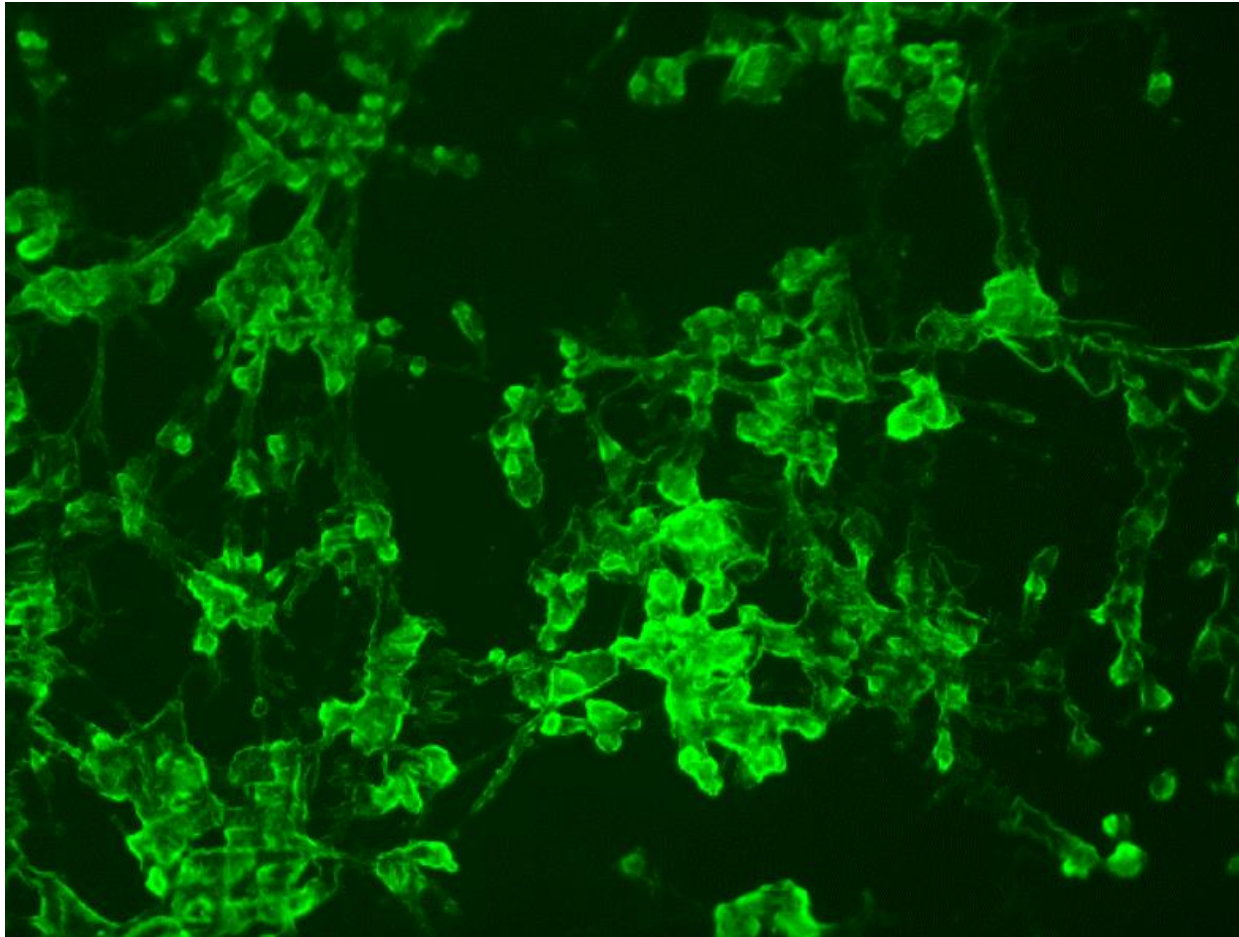


<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=ha-test>

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

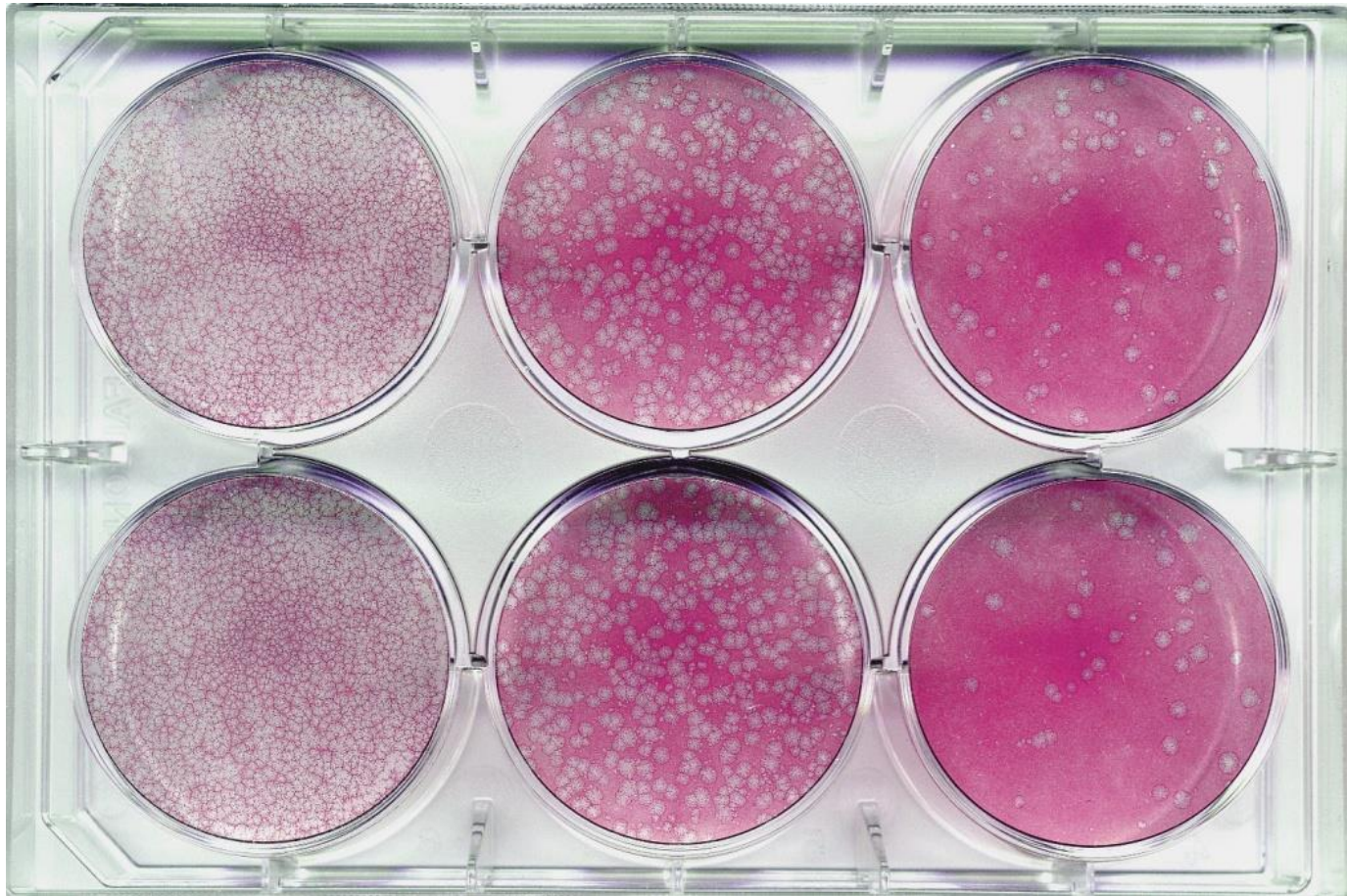


# DETECÇÃO VIRAL



IFA – VERO infectadas com NDV

# DETECÇÃO VIRAL



PFU

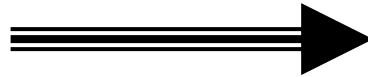
# ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE BACTÉRIAS



*Salmonella* sp. – Ágar SS



*Escherichia coli* – Ágar MacConkey



*Testes Bioquímicos*

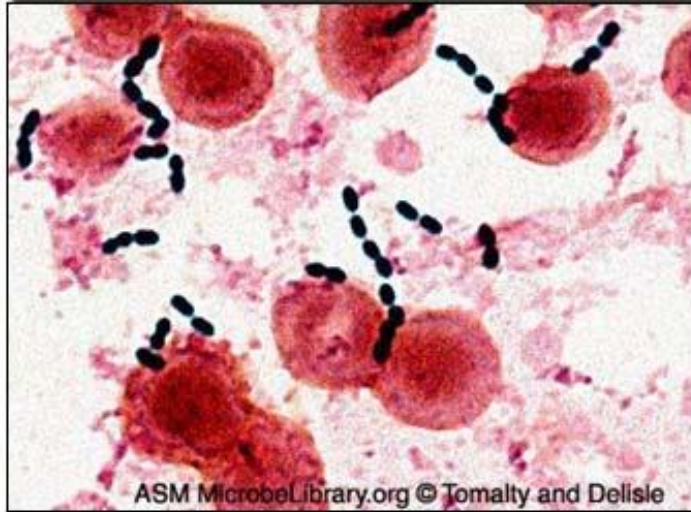


Ágar Tríplice Acúcar Ferro

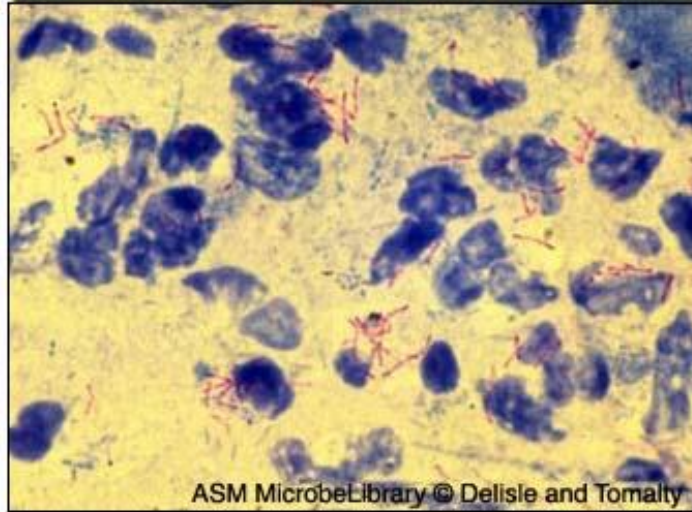


# ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

Gram stain of *Enterococcus faecalis*



Z-N stain of *Mycobacterium tuberculosis*



Gram stain of *Salmonella* sp.

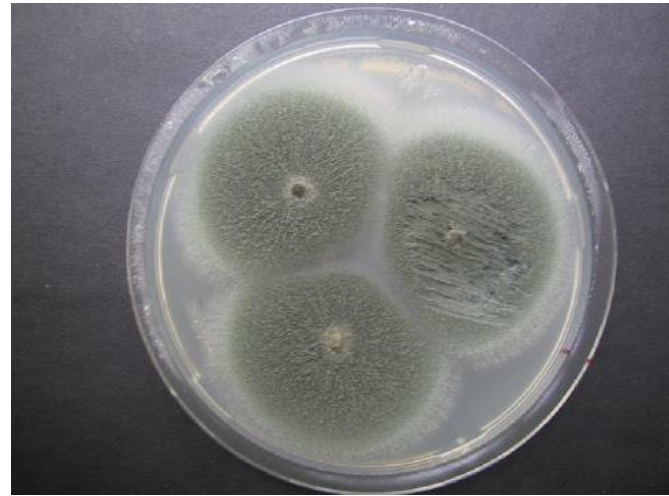




# ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE FUNGOS



*Aspergillus flavus*

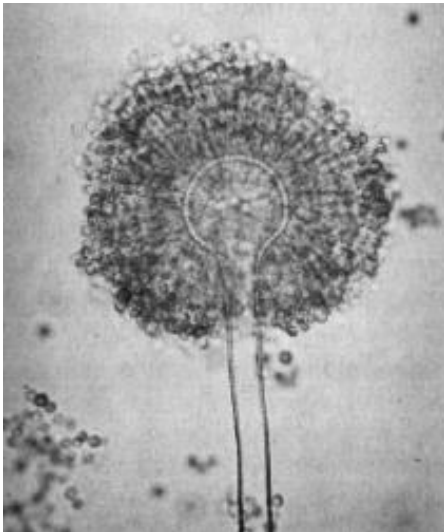


*Aspergillus fumigatus*

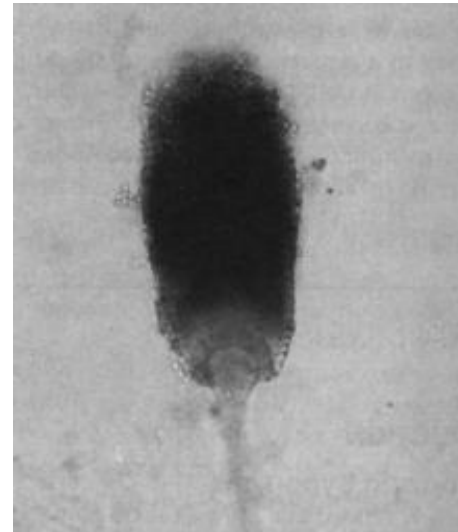


*Aspergillus parasiticus*

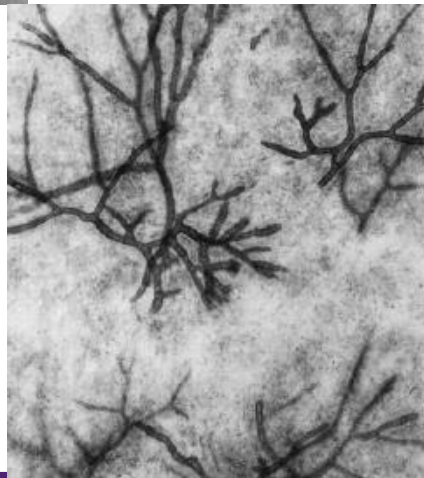
# ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE FUNGOS



*Aspergillus flavus*

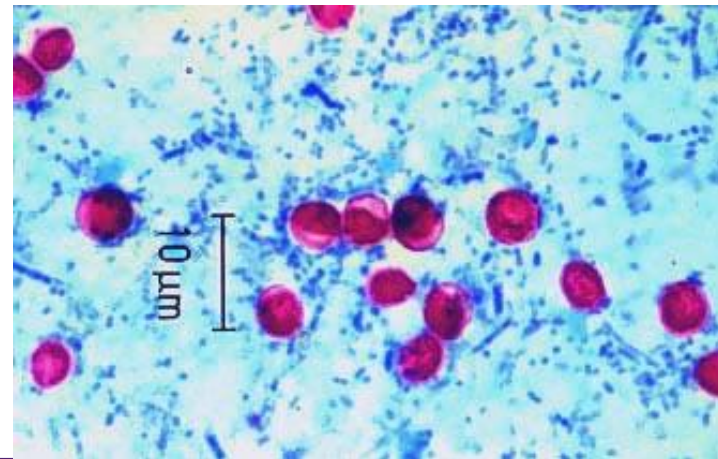
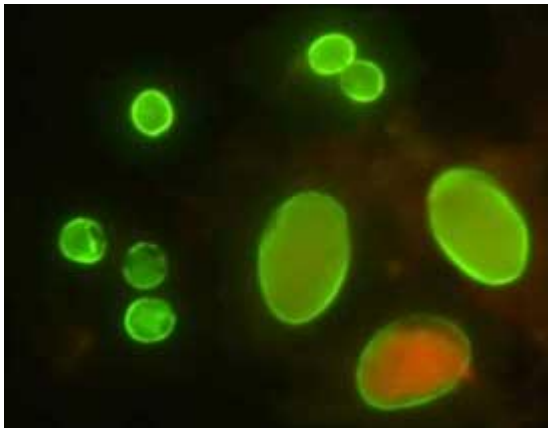


*Aspergillus fumigatus*



*Aspergillus flavus*

# IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS



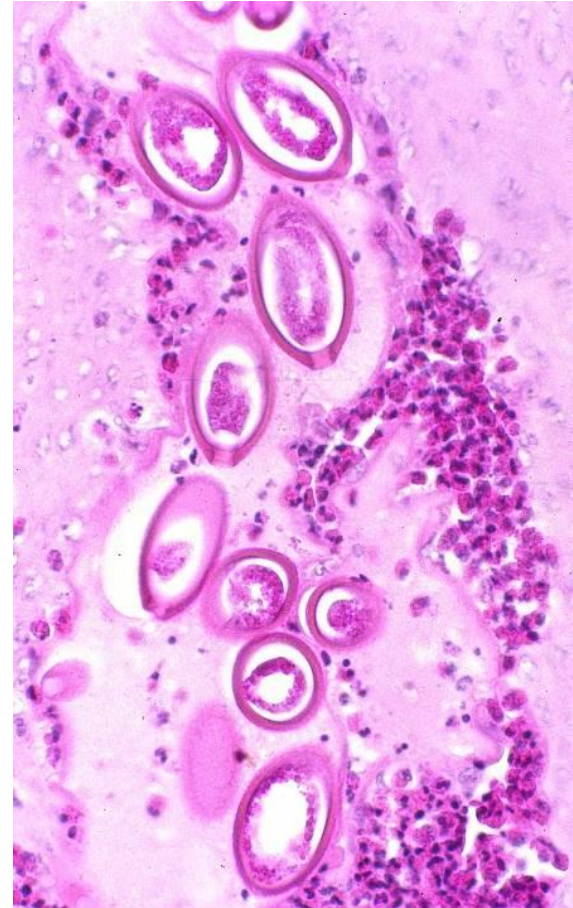
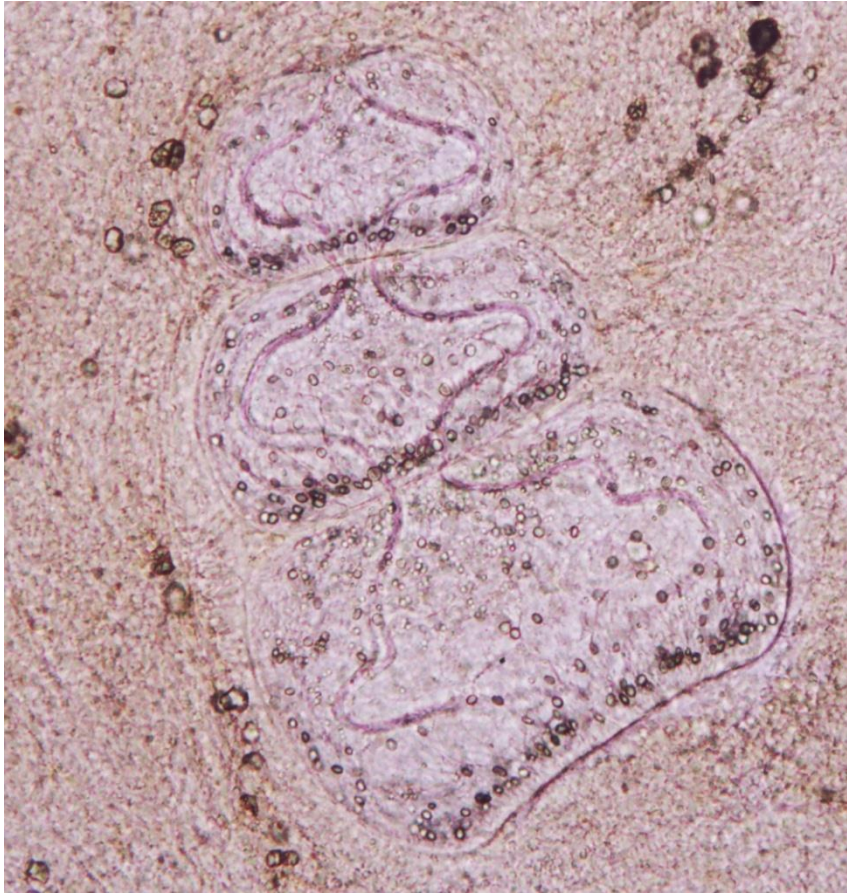


# IDENTIFICAÇÃO DE ENDOPARASITOS





# IDENTIFICAÇÃO DE ENDOPARASITOS



# IDENTIFICAÇÃO DE ENDOPARASITOS





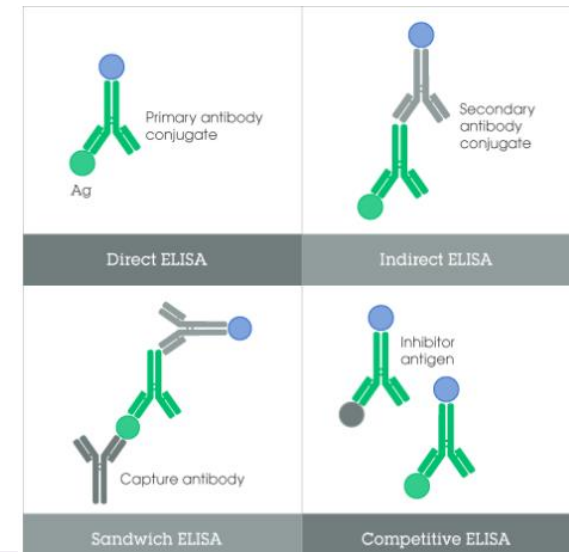
# IDENTIFICAÇÃO DE ECTOPARASITOS



# TESTES PARA A DETECÇÃO DE ANTÍGENOS

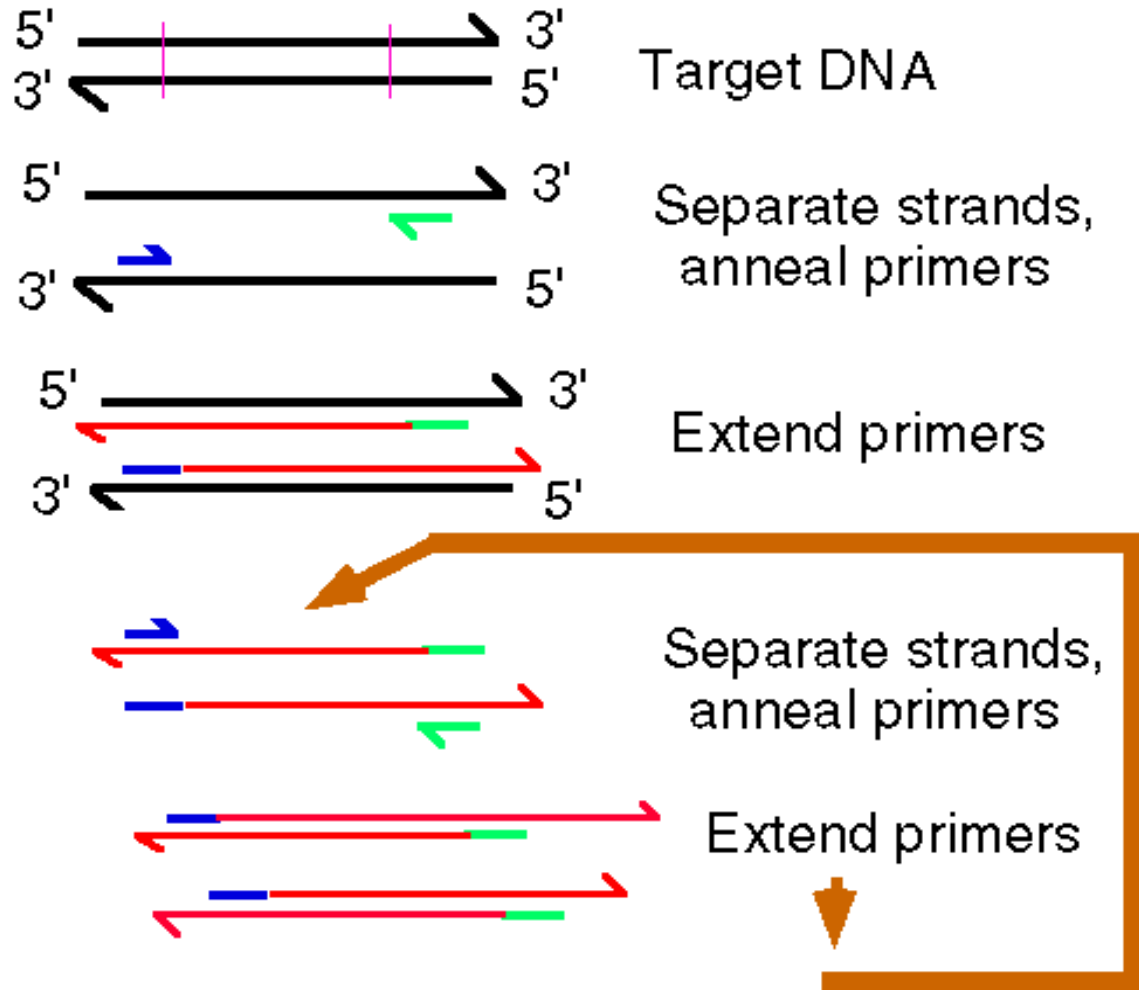
A detecção de antígenos pode ser realizada utilizando diferentes técnicas a partir de amostras clínicas ou isolados de culturas (virais, bacterianas, fúngicas).

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

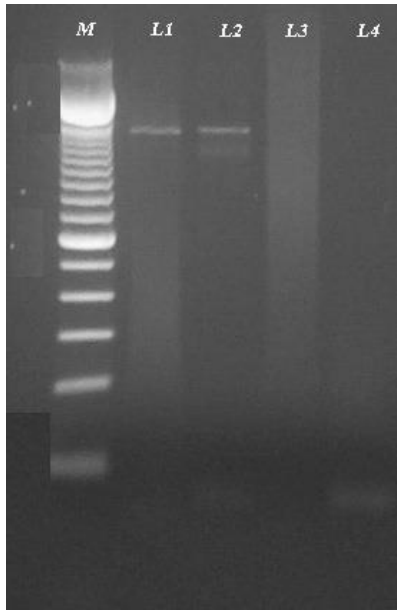




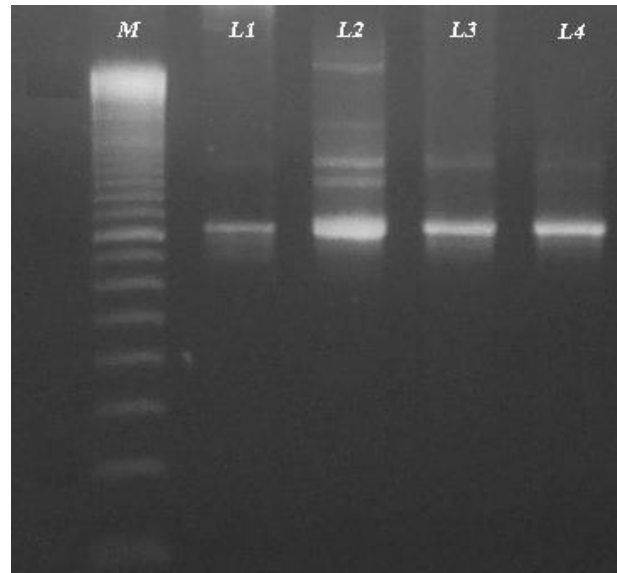
# BIOTECNOLOGIA



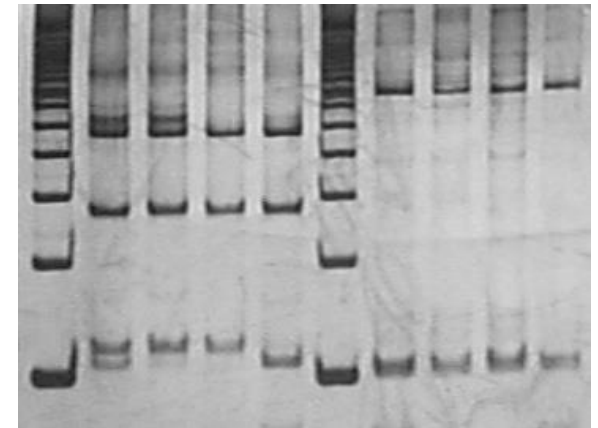
# BIOTECNOLOGIA



PCR

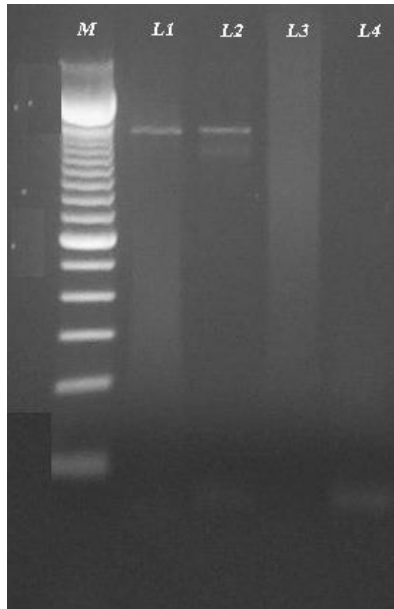


RT-PCR

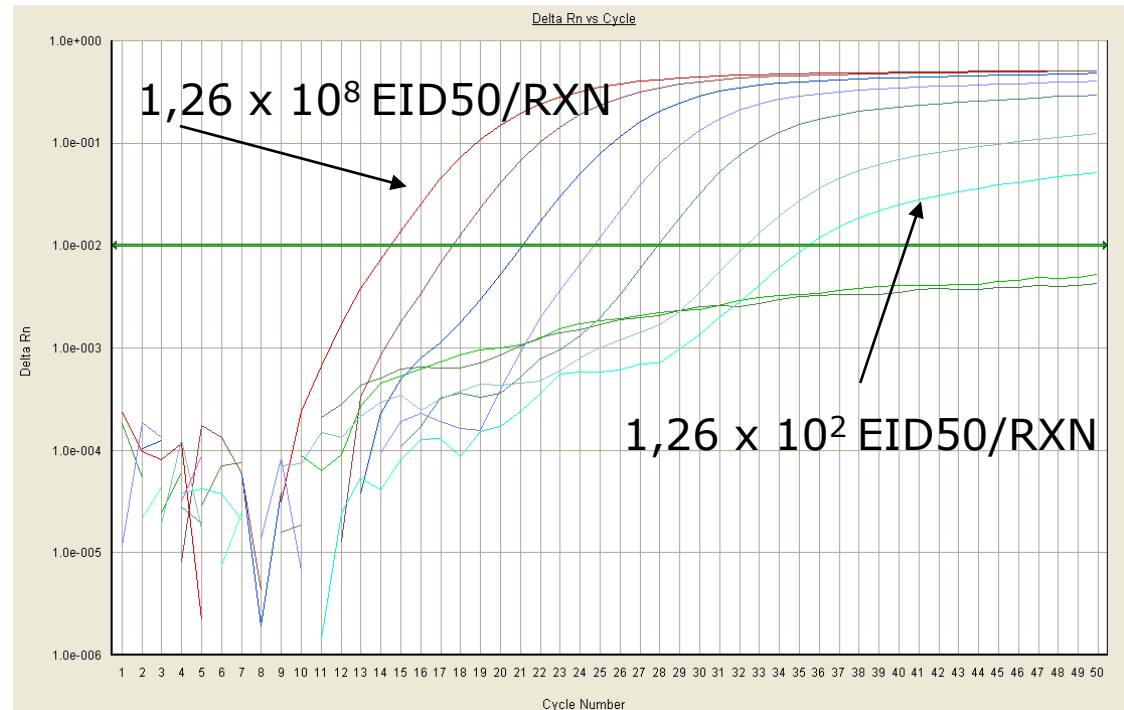


PCR-RFLP

# BIOTECNOLOGIA



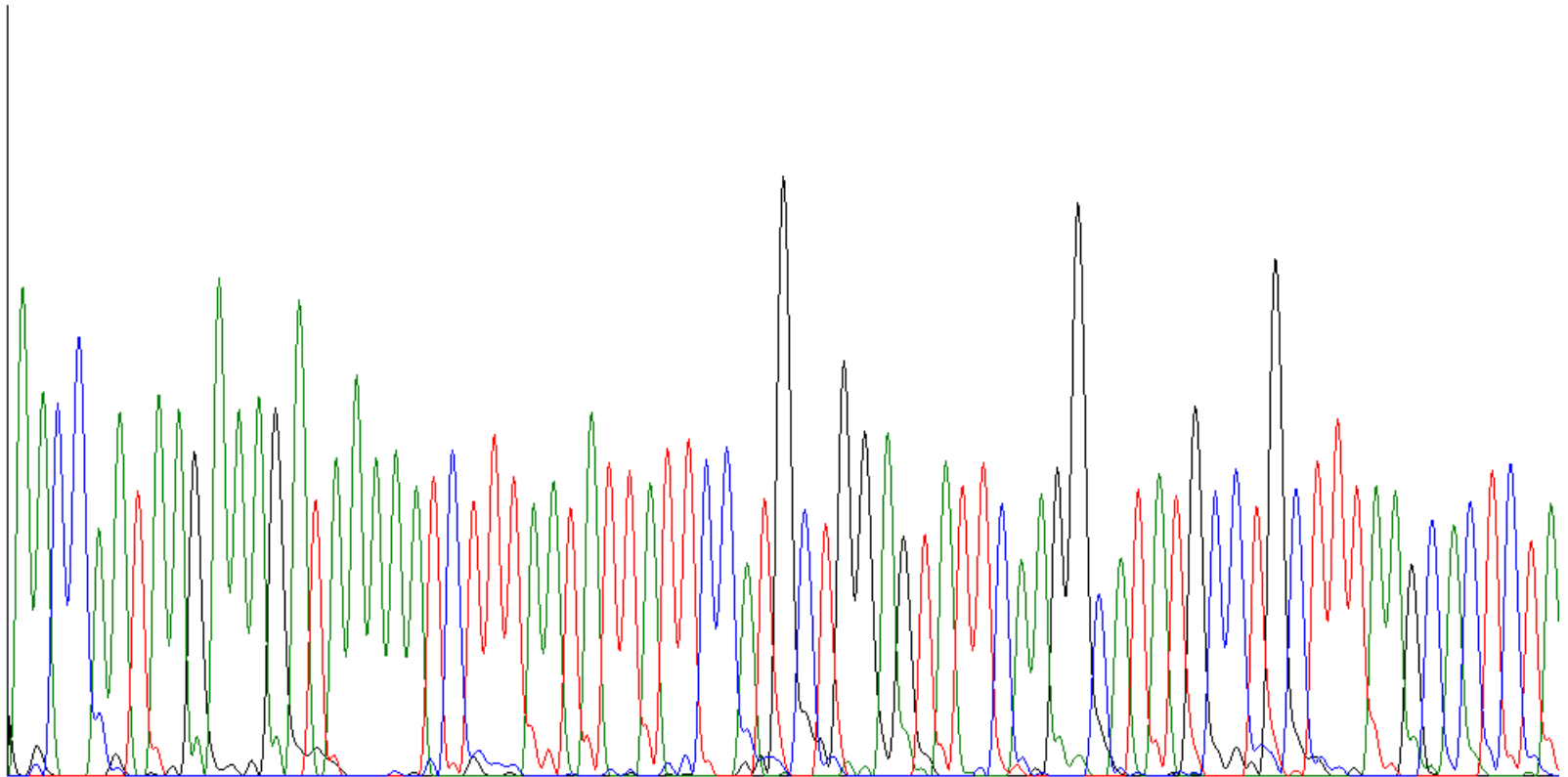
RT- PCR



RT-qPCR

# SEQUENCIAMENTO

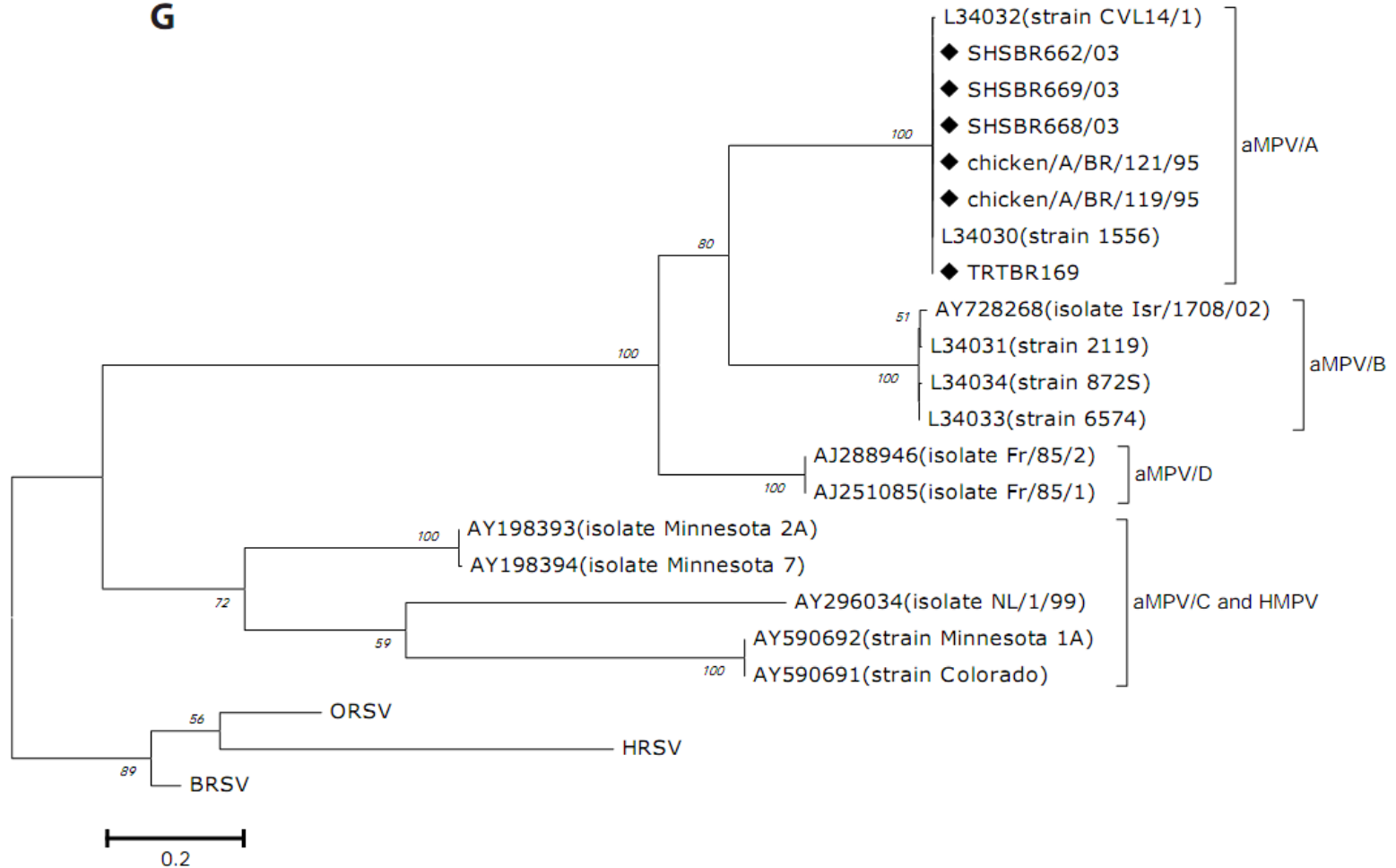
200 210 220 230 240 250 260 270  
AACCAATAAGAAAGATAAAAAATCTTTAATATTATTCATGCTGGAGTATTCAAGGCATATGCTGCTTTAAGCACCTTA





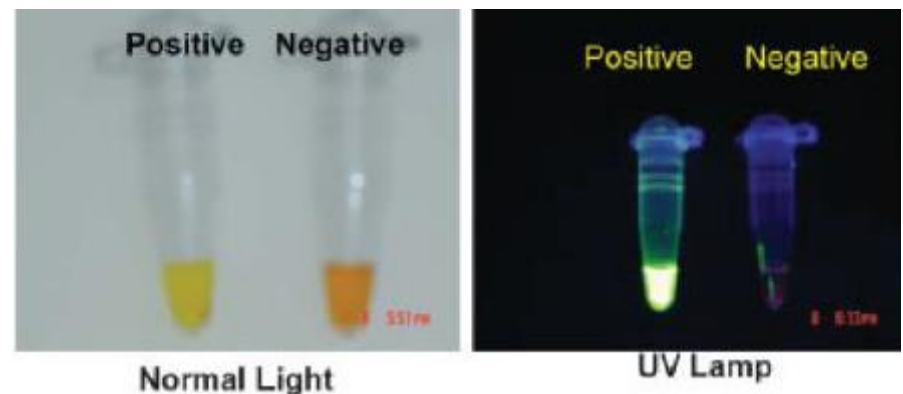
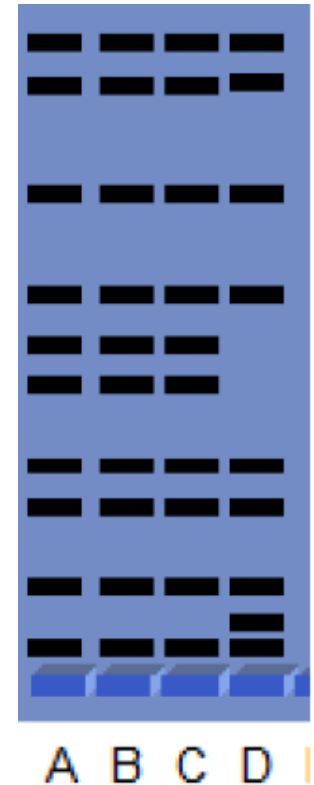
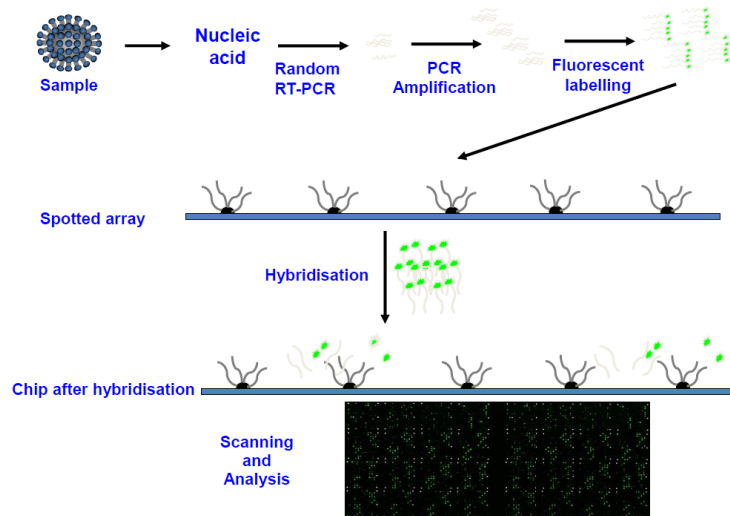
# EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

G



# Outras técnicas moleculares

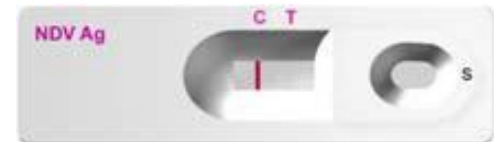
- DNA fingerprint
- LAMP
- Microarray



# TESTES RÁPIDOS DE DETECÇÃO



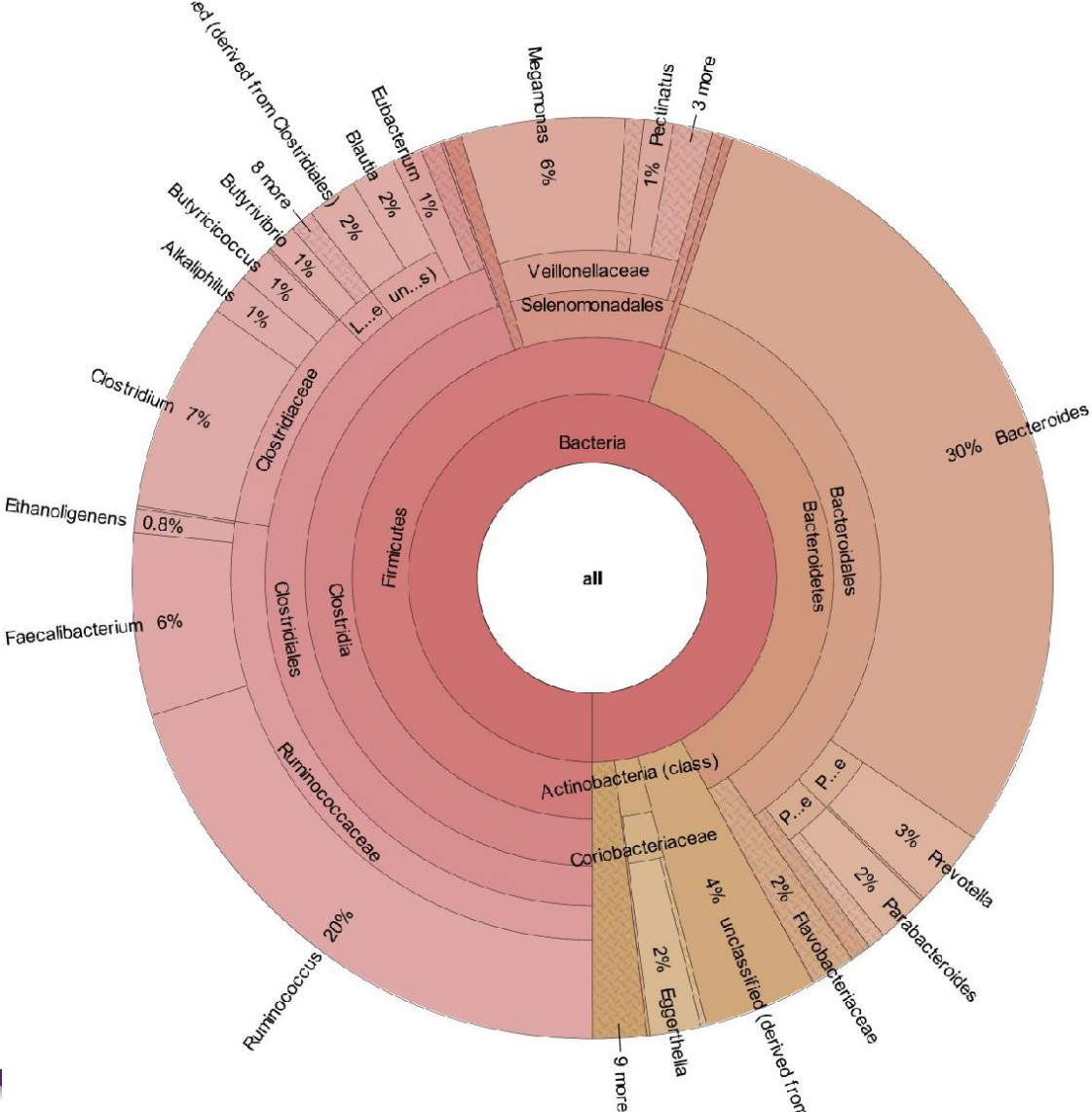
Positivo



Negativo

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

# METAGENÔMICA





# SOROLOGIA

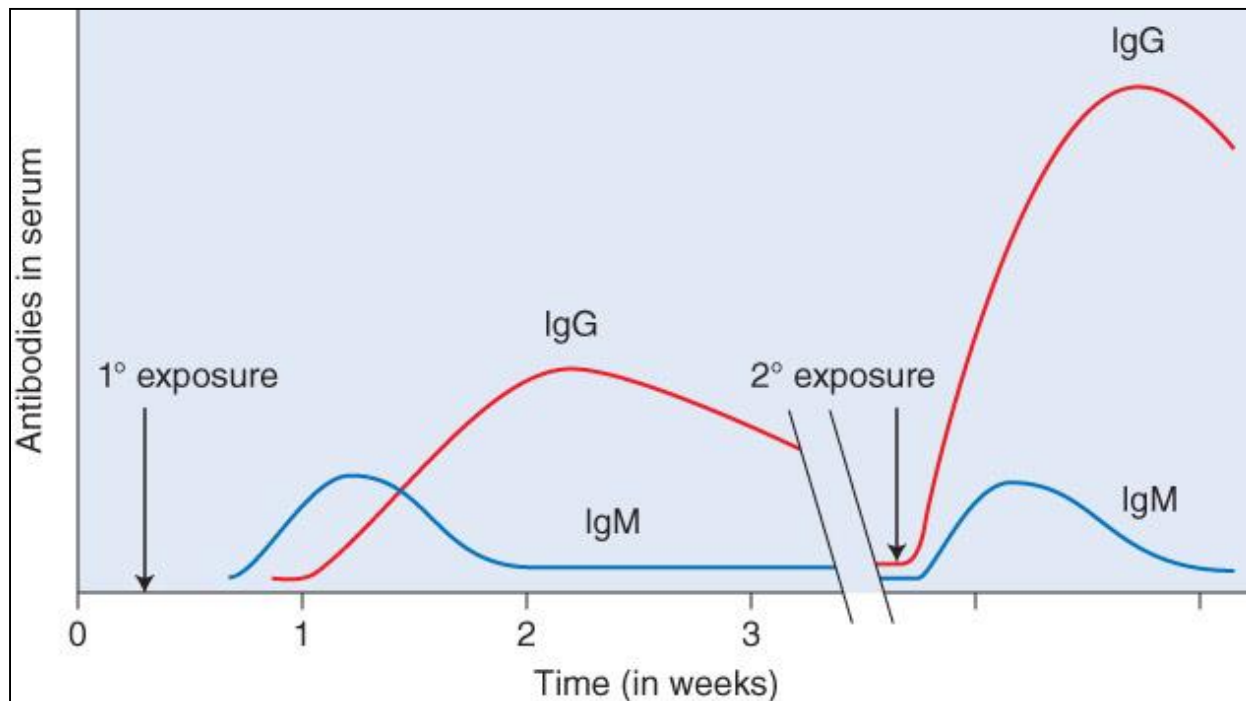
Detecção do aumento do nível de anticorpos entre a fase aguda e convalescente da infecção.

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

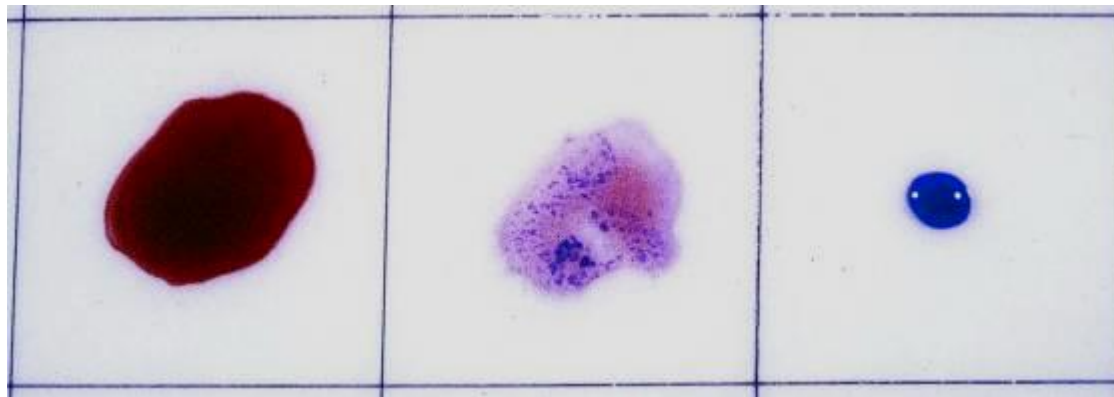
- Aumento do título de anticorpos IgY entre fase aguda e convalescente
- Ausência ou pequeno aumento de IgM

# SOROLOGIA





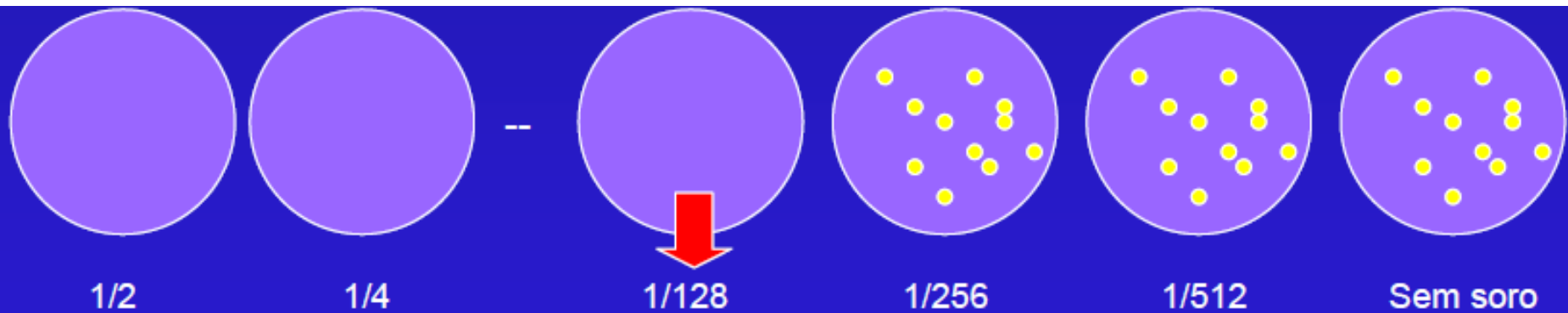
# TESTES SOROLÓGICOS



**Hemaglutinação com sangue total**

# SORONEUTRALIZAÇÃO

- **Diluir o soro**
- Adicionar volume igual de vírus (100 DICCC50)
- Incubar a 37°C
- Colocar mistura sobre células
- Última diluição SEM multiplicação viral é o título



# IMUNODIFUSÃO EM AGAR GEL

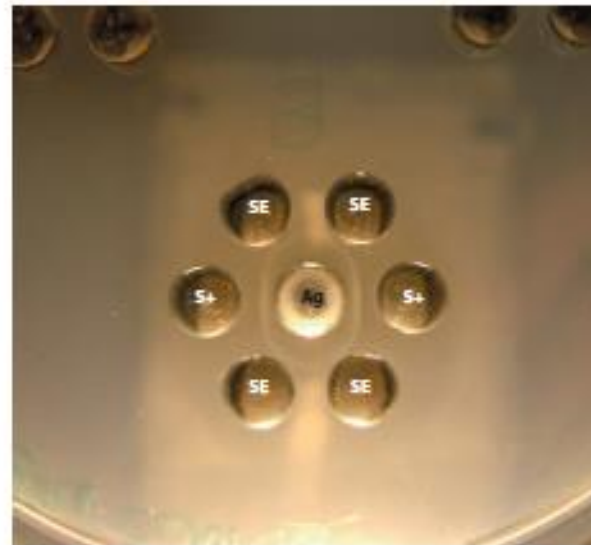
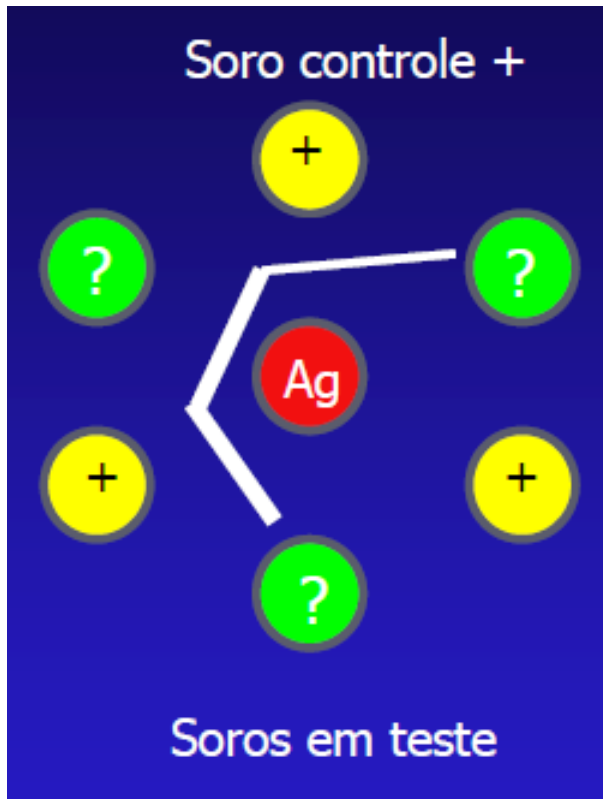


Fig. 7.8 Agar gel precipitation assay. Ag Reference antigen, S+ positive serum, SE serum under examination

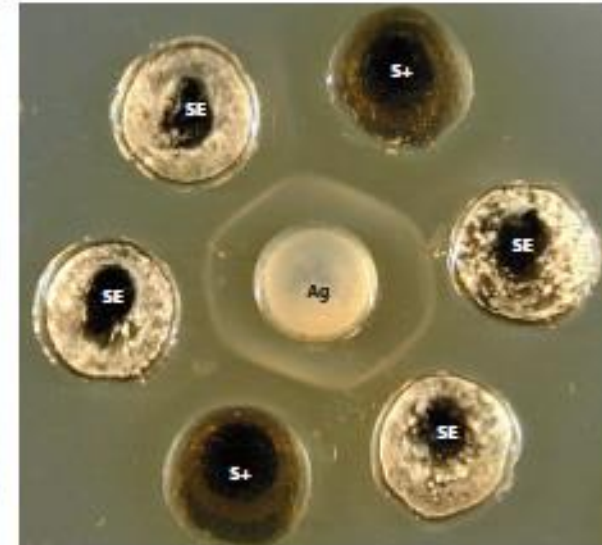
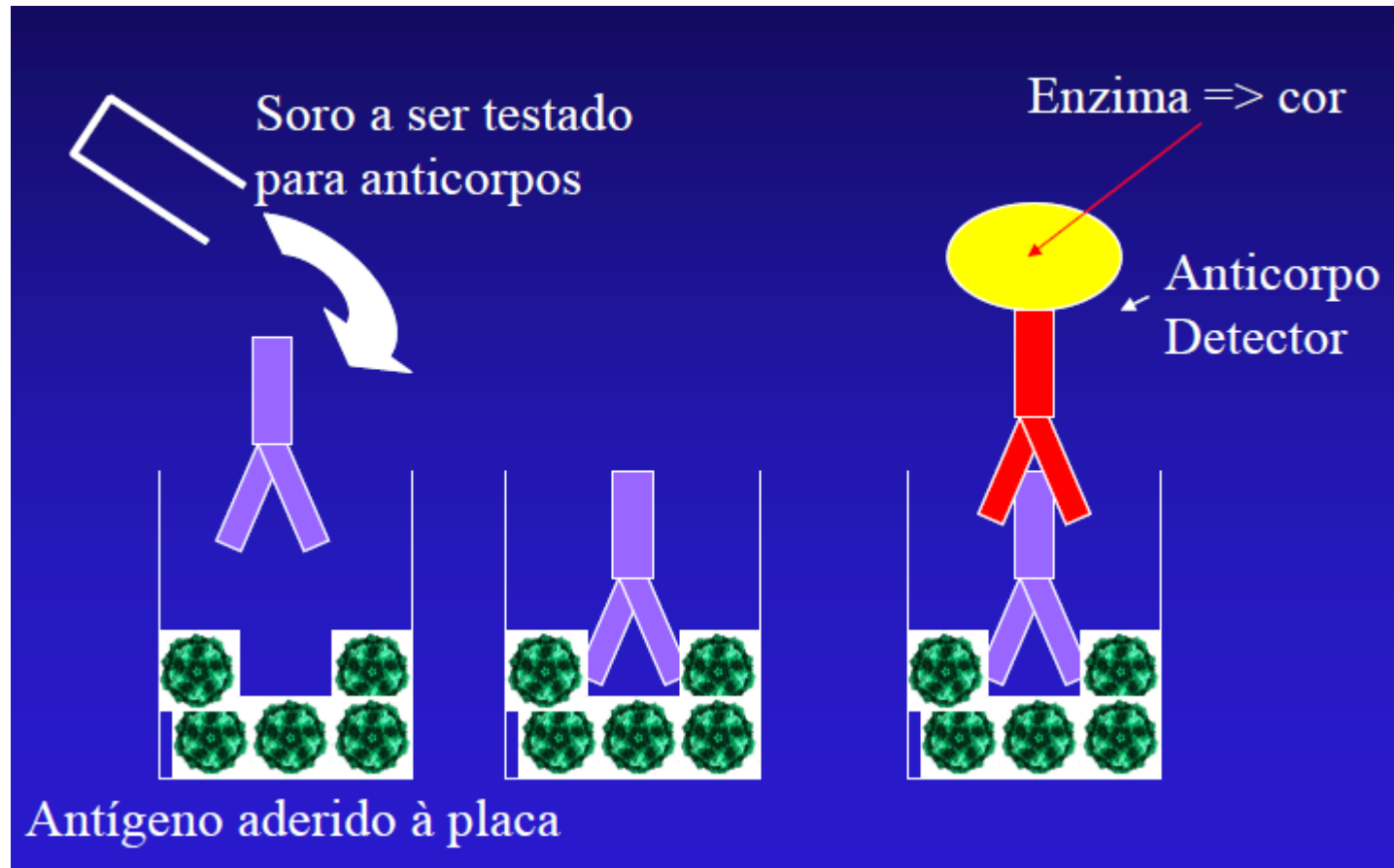
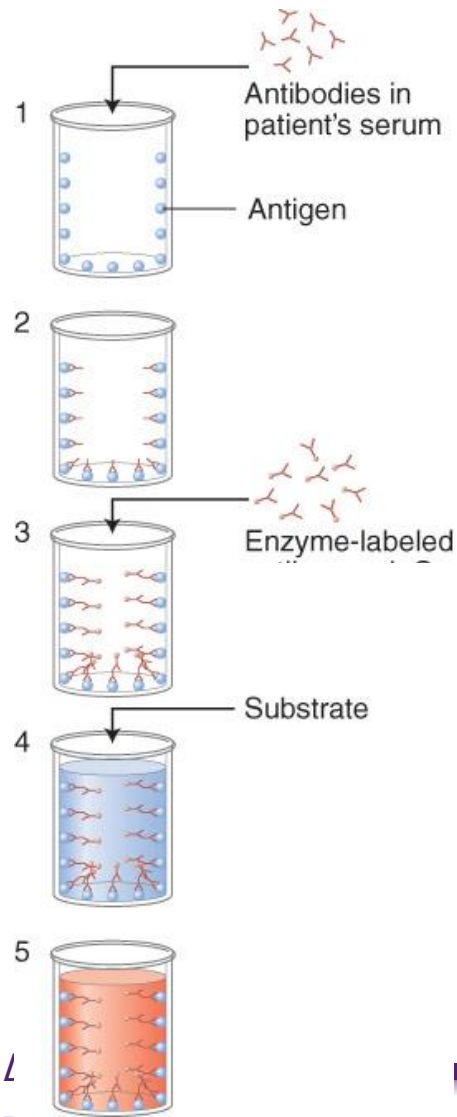


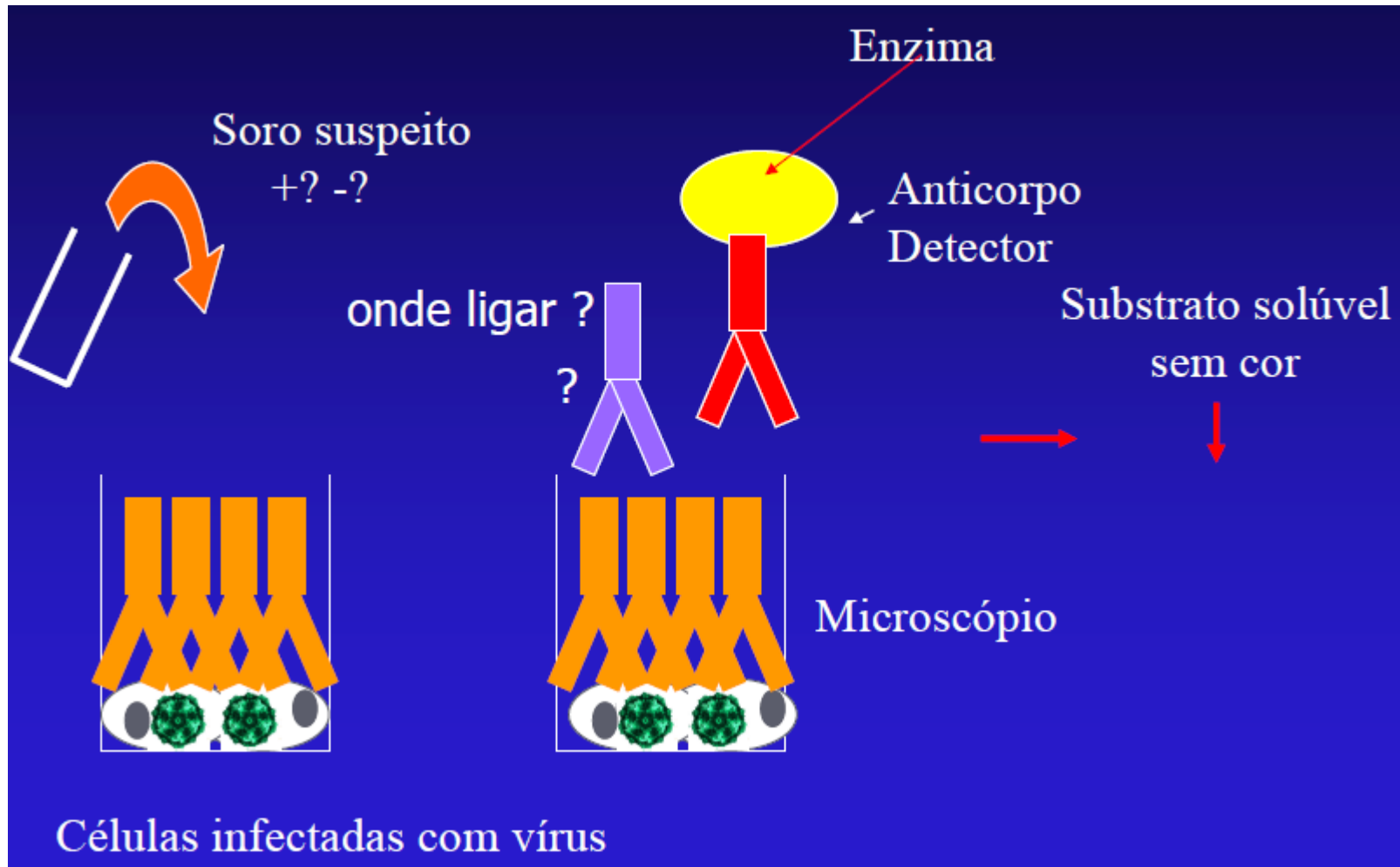
Fig. 7.9 Agar gel precipitation assay: Ag Antigen, S+ positive serum, SE serum under examination

# ELISA (INDIRETO)

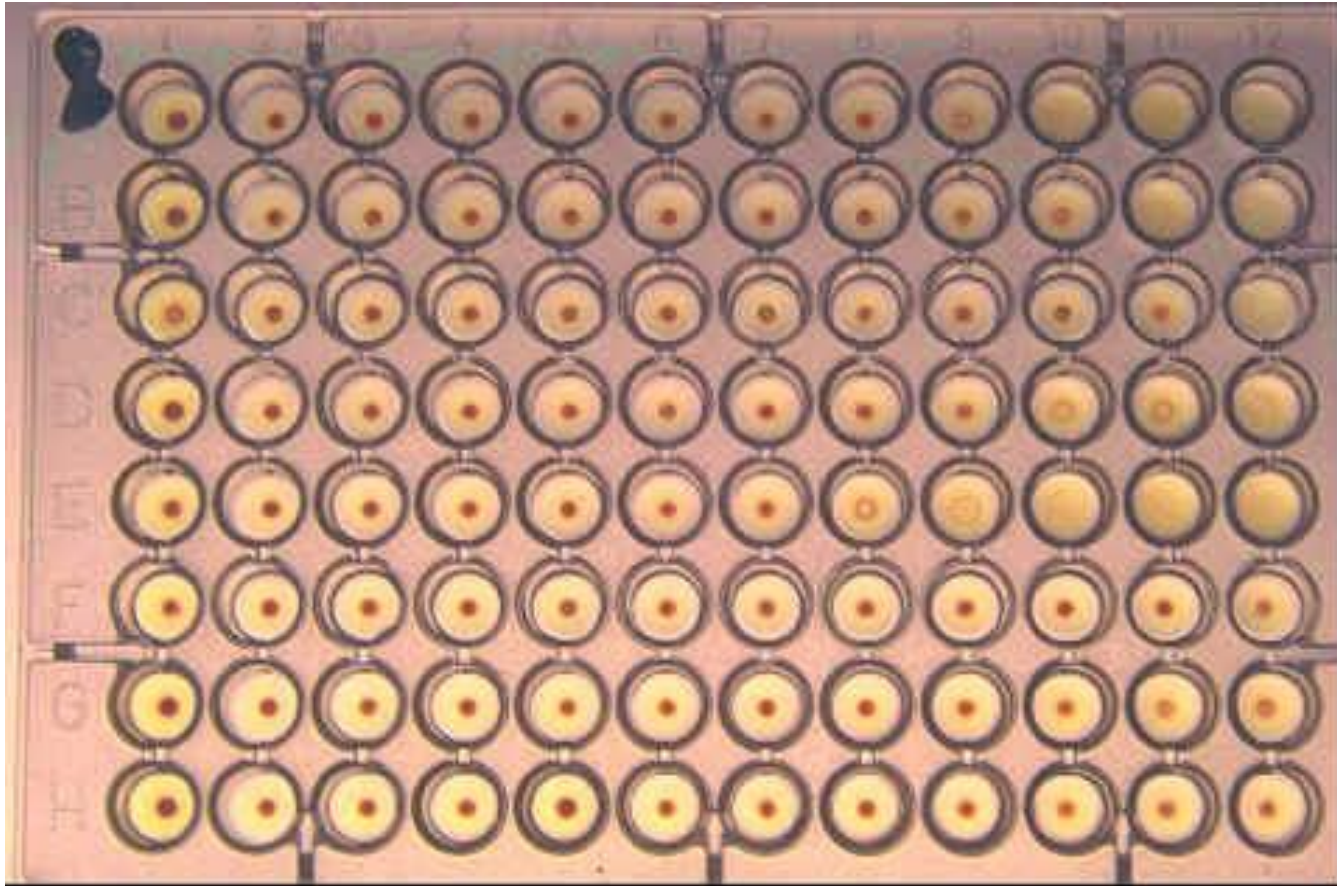




# ELISA (BLOQUEIO)

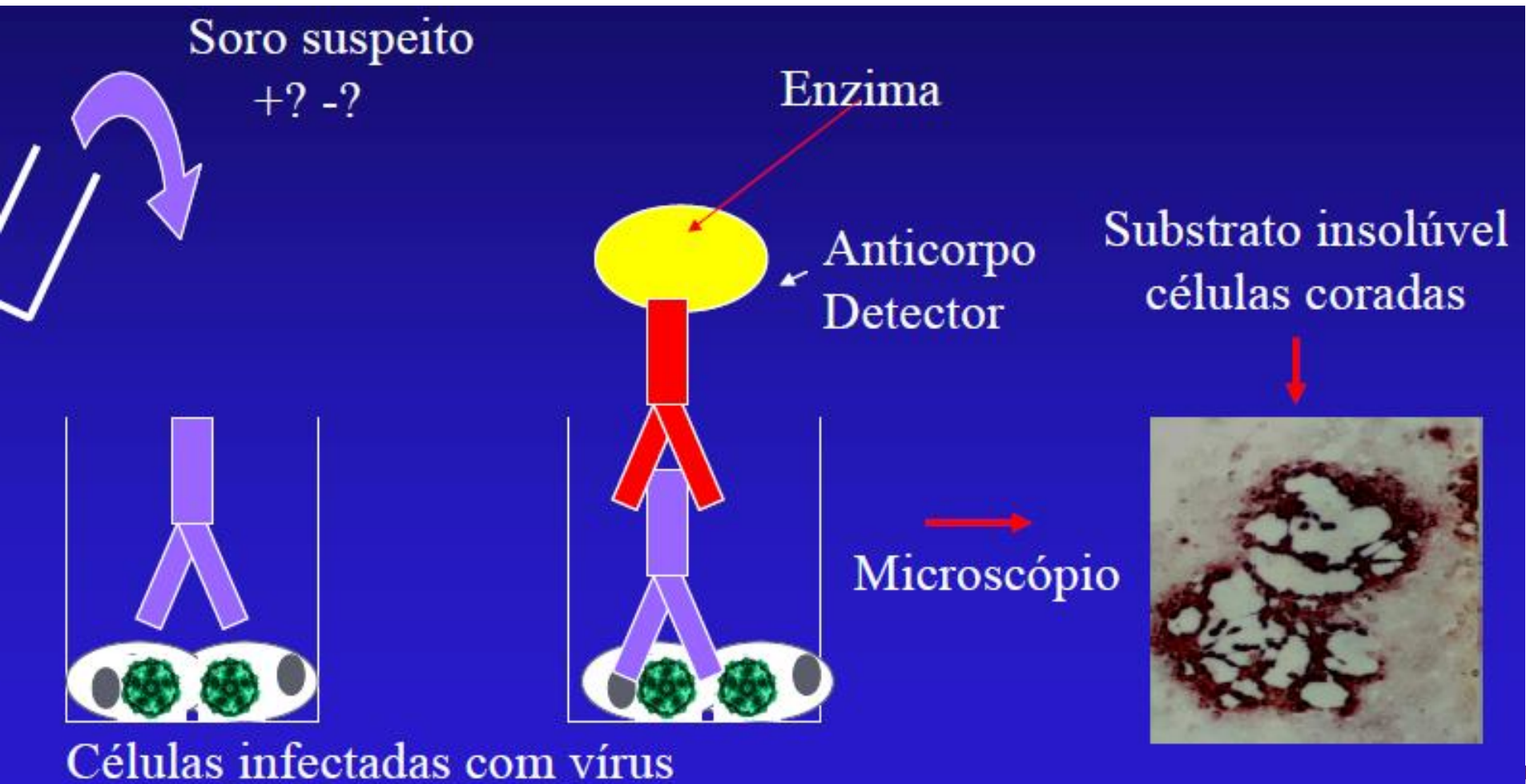


# INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO



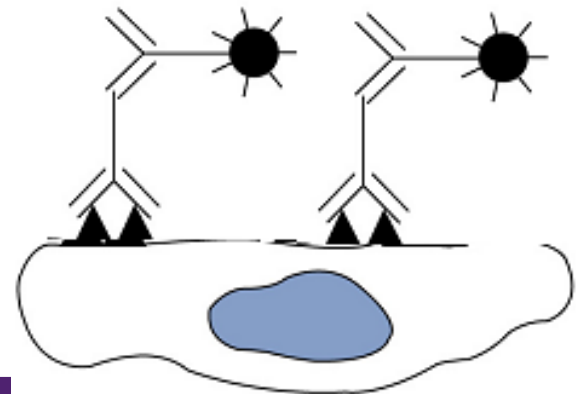
<http://www.cfsph.iastate.edu/video.php?link=hi-test>

# IMUNOHISTOQUÍMICA



# IMUNOFLUORESCÊNCIA

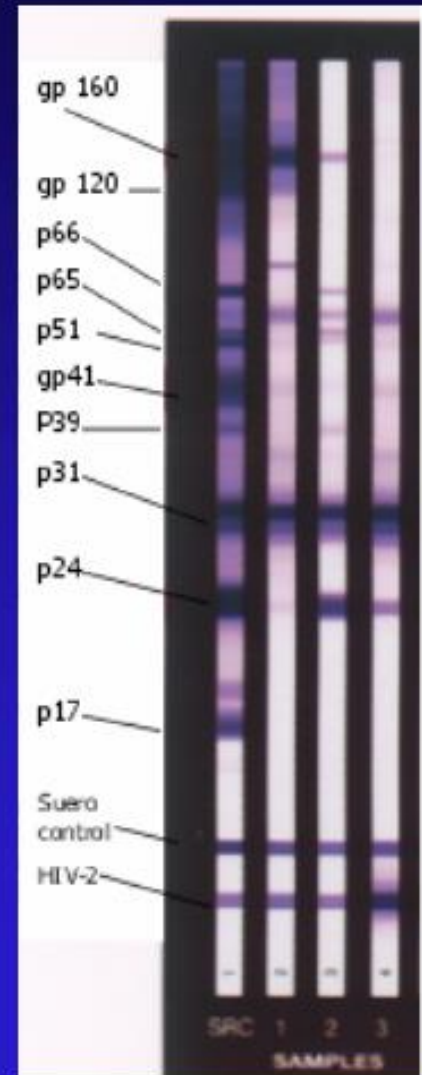
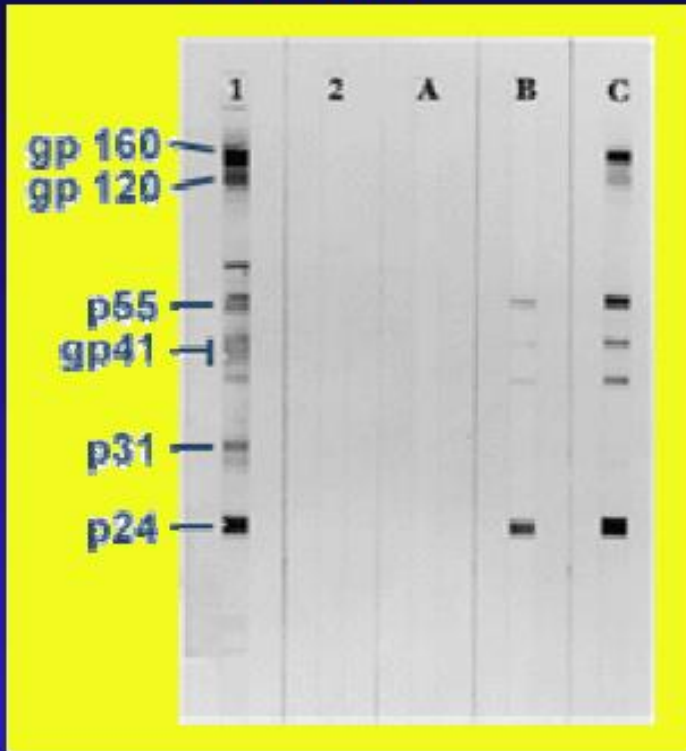
- Indireta para a detecção de anticorpos:
- Material infectado conhecido (células ou tecidos)
- + soro suspeito (ex: soro galinha)
- + conjugado anti-IgG específico (ex. anti-IgY galinha conjugado à fluoresceína)
- + luz UV





# WESTERN BLOT

## Western Blot

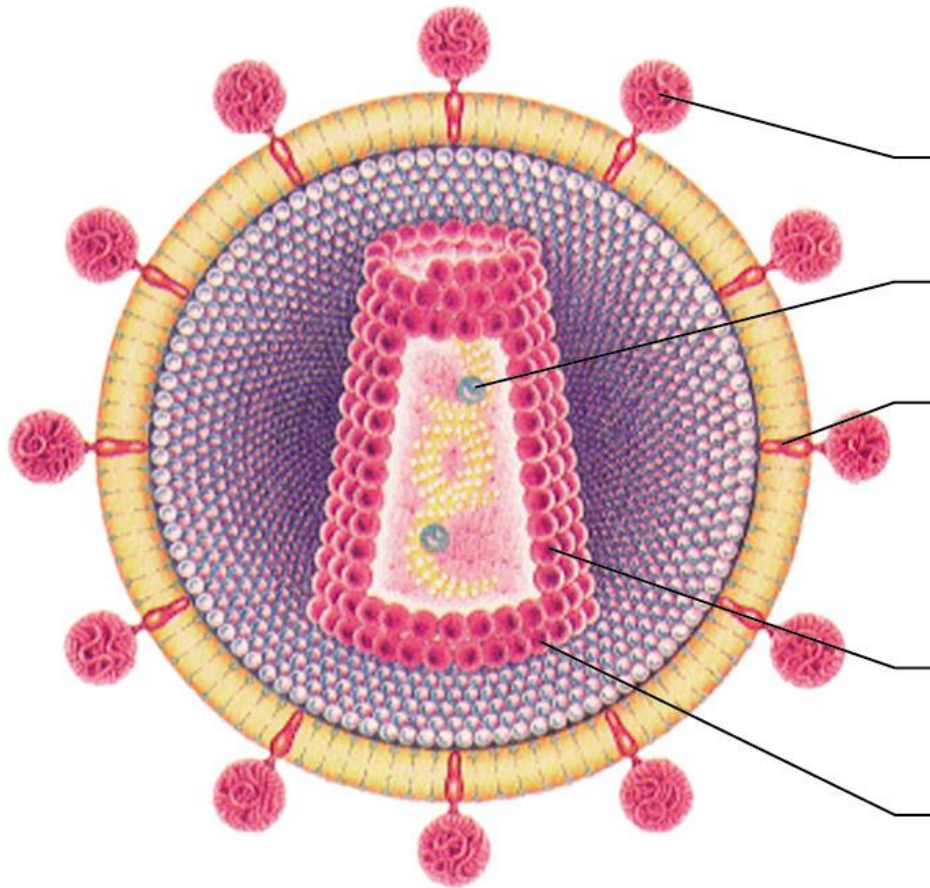


**Crêterios:**

**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