

ADRIANA GOMES DE ANDRADE

***IMMUNO-DOT BLOT PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA
DENGUE EM *Aedes aegypti* E EM *Aedes albopictus****

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

ADRIANA GOMES DE ANDRADE

***IMMUNO-DOT BLOT PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA
DENGUE EM *Aedes aegypti* E EM *Aedes albopictus****

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

APROVADA: 20 de abril de 2004.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof^a. Maria Aparecida Scatamburlo
Moreira

Prof. José Rogério de Oliveira

Prof. Jose Mario da Silveira Mezencio
(Orientador)

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A553i
2004

Andrade, Adriana Gomes de, 1978-
Immuno-dot blot para detecção do vírus da dengue
em *Aedes aegypti* e em *Aedes albopictus* / Adriana
Gomes de Andrade. – Viçosa : UFV, 2004.
xv, 43f. : il. ; 29cm.

Orientador: Jose Mario da Silveira Mezencio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 36-43.

1. Dengue - Diagnóstico. 2. Immunoblotting. 3. Teste
imunoenzimático. 4. *Aedes aegypti*. 5. *Aedes albopictus*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.99256

AOS MEUS QUERIDOS PAIS, JOAQUIM E MARIA

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que me ilumina e guia em todos os dias da minha vida.
- Aos meus queridos pais, que sempre confiaram na minha capacidade.
- Às minhas irmãs e irmão, sempre presentes nesta jornada.
- Ao Sidnei, que tanto me apoiou e sempre soube me compreender com carinho incondicional.
- À Universidade Federal de Viçosa, por me proporcionar um ensino de qualidade.
- Ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.
- Ao Departamento de Biologia Geral, pela colaboração.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante a realização do Curso.
- Ao professor Jose Mario da Silveira Mezencio, pela orientação mais que científica.
- Ao professor Murilo Geraldo de Carvalho, pela especialíssima colaboração na realização desta dissertação.
- À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, professora Célia Alencar de Moraes e ao professor Arnaldo Chaer Borges, pelos conselhos e preciosa atenção.

- À Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) de Ubá, pelo material coletado.
- À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pelo soro humano cedido.
- Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular, por grandes momentos em todos estes anos de convívio.
- Às minhas amigas de todas as horas Malu, Juliana, Flávia, Marciane e Maria, que sempre levantaram o meu astral.
- Aos amigos Marcos, Dyana, Ellencristina, Bruno e Cleverson, que cada um a sua maneira sempre se mostraram amigos verdadeiros.
- A todos meus professores.
- A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

Adriana Gomes de Andrade, filha de Joaquim Damasceno de Andrade e Maria Panágia de Andrade, nasceu na cidade de João Monlevade, MG em 02 de maio de 1978.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em março de 1997, concluindo a graduação em Ciências Biológicas em agosto de 2001.

Em agosto de 2001, iniciou o programa de mestrado em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CONTEÚDO

LISTA ABREVIATURAS.....	viii
LISTA TABELAS.....	x
LISTA FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Local da pesquisa.....	14
2. Cultura de células.....	14
2.1. Células de <i>Aedes albopictus</i>	14
2.2. Células VERO.....	15
3. Vírus.....	15
4. Multiplicação do vírus dengue.....	16
5. Titulação de DEN-1 e DEN-2.....	17
6. Purificação do vírus dengue.....	17
7. Preparo do adjuvante incompleto de Freund.....	18
8. Preparo do imunógeno.....	18
9. Obtenção dos anti-soros.....	19

10. Coleta de mosquitos e larvas.....	19
11. Preparo de sobrenadante oriundo de larvas ou mosquitos macerados.....	20
12. <i>Immuno-dot blot</i>	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
RESUMO E CONCLUSÕES.....	34
BIBLIOGRAFIAS.....	36

LISTA ABREVIATURAS

Aedes aegypti L: Homogenato de larvas de *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti M: Homogenato de mosquitos de *Aedes aegypti*.

Aedes albopictus L: Homogenato de larvas de *Aedes albopictus*.

Ag DEN-1 P: Antígenos do vírus DEN-1 purificado.

Ag DEN-2 P: Antígenos do vírus DEN-2 purificado.

Ag DEN-1 H: Antígenos do vírus DEN-1 Havaí.

Ag DEN-2 NG: Antígenos do vírus DEN-2 Nova Guiné.

Ag DMEM: Antígenos do meio DMEM sem soro fetal bovino.

Ag PTN-DMEM: Antígenos de proteínas do soro fetal bovino e meio DMEM.

Ag PTN-MEM: Antígenos de proteínas do soro fetal bovino e meio MEM.

Ag PTN: Antígenos do soro fetal bovino.

Ag MAY: Antígenos do vírus Mayaro.

DEN-1: Sorotipo 1 do vírus da dengue.

DEN-2: Sorotipo 2 do vírus da dengue.

DEN-3: Sorotipo 3 do vírus da dengue.

DEN-4: Sorotipo 4 do vírus da dengue.

DHF/DSS: Dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

ECT: Efeito citopático

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde.

FUNED: Fundação Ezequiel Dias.

MEM: Modified Eagle Medium.

Larvas NI: Larvas não identificadas.

LISTA TABELAS

1. Números de casos notificados de dengue clássica, febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue e óbitos, por mês e região, Brasil, 2003⁽¹⁾ 7
2. Número de casos notificados de dengue clássica entre janeiro e agosto, por região do Brasil, entre 2002 e 2003..... 8

LISTA FIGURAS

1. Distribuição do mosquito *Aedes aegypti* no mundo (Fonte: Organização Mundial de Saúde/1997)..... 4
2. Sorotipos circulantes do vírus da dengue por estados brasileiros até o mês de agosto de 2003 (Fonte: FUNASA)..... 8
3. Municípios que registraram a presença de *Aedes albopictus* no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2002. Dados do Sistema de Informação em Febre Amarela e Dengue/FUNASA e informações complementares (Fonte: DEGALLIER et al., 2003)..... 9
4. Aspecto do dorso dos mosquitos *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B) (Fonte: Organização Mundial de Saúde/1997)..... 10
5. Resultados dos testes de *immuno-dot blot*, comparando a reação dos vírus DEN-1 e DEN-2 purificados (P) com as amostras de vírus DEN-1 (Havai=H) e DEN-2 (Nova Guiné=NG), amostras sementes. Linha A, B, C e D diferentes amostras de soros humanos reativos para dengue. Linha E controle positivo da reação, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados..... 24
6. Resultados dos testes de *immuno-dot blot* para os anti-soros de coelhos produzidos para vírus DEN-1 (Havai) e DEN-2 (Nova

	Guiné). Linha A anti-soro policlonal de coelho imunizado com DEN-1 (Havaí) (AS DEN-1 H). Linha B anti-soro policlonal de coelho imunizado com DEN-2 (Nova Guiné) (AS DEN-2 NG). Linha C controle positivo da reação; antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-4) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 5-8).....	25
7.	Resultados dos testes de <i>immuno-dot blot</i> utilizados para a determinação das menores diluições de soro reativo para dengue. Nas linhas A, B, C e D as colunas de 1-12 representam as diluições 1/2 a 1/4096 dos homogeneizados. Linha E: controles positivos (colunas 1-6) e controles negativos (colunas 7-12), antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 1-4 e 7-12) e com anti-soro de coelho (colunas 5-6).....	26
8.	Resultados dos testes de <i>immuno-dot blot</i> dos experimentos para verificar as menores diluições dos anti-soros policlonais de coelhos imunizados com vírus DEN-1 (Havaí) e DEN-2 (Nova Guiné). Linhas A, B, E e G diluição seriada do anti-soro policlonal de coelho imunizado com vírus DEN-1 (sem diluir, 1/2 até 1/2048). Linhas C, D e F diluição seriada do anti-soro policlonal de coelho imunizado com vírus DEN-2 (sem diluir, 1/2 até 1/2048). Linha H controles positivos, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-6) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 7-12).....	27
9.	Resultados dos testes de <i>immuno-dot blot</i> dos experimentos para verificar a menor diluição dos homogenatos (sem diluir, 1/2 a 1/2048) ao qual o soro humano reativo para dengue reage positivamente. Linhas A, B e C soro humano reativo para dengue diluído 1:32. Linha D controles positivos, antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 1-10) e antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 11-12).....	28

10. Resultados dos testes de *immuno-dot blot* dos experimentos com vírus DEN-1 não diluído para verificar a menor diluição dos homogenatos (sem diluir, 1/2 a 1/2048) aos qual o anti-soro de coelho é reativo. Linha A, B, C, D, E, F e G anti-soro policlonal de coelho imunizado. Linha G controles positivos, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-6) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 7-12). Linha H soro humano reativo para dengue..... 29
- 11 Resultados dos testes de *immuno-dot blot* dos experimentos com vírus DEN-2 diluído 1:2 para verificar a menor diluição dos homogenatos (sem diluir, 1/2 a 1/2048) ao qual o anti-soro de coelho é reativo. Linha A, B, C, D, E, F e G anti-soro policlonal de coelho imunizado. Linha G controles positivos, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-6) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 7-12). Linha H soro humano reativo para dengue..... 32
12. Resultados do teste de *immuno-dot blot* das reações dos homogenatos de larvas de *Aedes albopictus* (*Aedes albopictus* L), e homogenatos de larvas e mosquitos de *Aedes aegypti* (*Aedes aegypti* L e *Aedes aegypti* M, respectivamente), contra soros humanos reativos para dengue. Linha A, B, C e D diferentes amostras de soros humanos reativos para dengue. Linha E controle positivo da reação, antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue, colunas 1-4; antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados, colunas 5-9..... 33

RESUMO

ANDRADE, Adriana Gomes de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004. ***Immuno-dot blot para detecção do vírus da dengue em *Aedes aegypti* e em *Aedes albopictus****. Orientador: Jose Mario da Silveira Mezencio. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes, Arnaldo Chaer Borges e Maria Catarina Megumi Kasuya.

A avaliação de viabilidade de uso da técnica de *immuno-dot blot* para a detecção do vírus da dengue em homogenatos de larvas e de mosquitos *Aedes aegypti* e larvas de *Aedes albopictus* foi realizada utilizando-se soros humanos reativos para dengue e soros policlonais antidengue, produzidos em coelhos da raça Nova Zelândia imunizados com suspensões de vírus DEN-1 (Havaí) e DEN-2 (Nova Guiné) purificados e emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund. Os resultados demonstraram que a técnica apresenta sensibilidade adequada para a detecção do vírus da dengue em homogenatos de larvas e de mosquitos *A. aegypti* e larvas de *A. albopictus* ainda que os títulos dos anti-soros sejam baixos. A presença do vírus foi detectada em larvas do mosquito *A. albopictus*, o que pode contribuir para o monitoramento do vírus mesmo na ausência de surtos da doença. Pode, inclusive, contribuir para estudos epidemiológicos mais amplos desse vírus por fornecer ferramenta para esses estudos.

ABSTRACT

ANDRADE, Adriana Gomes de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, april of 2004. **Immuno-dot blot assay for detection of the virus of the dengue in *Aedes aegypti* and in *Aedes albopictus*.** Adviser: Jose Mario da Silveira Mezencio. Committee members: Célia Alencar de Moraes, Arnaldo Chaer Borges and Maria Catarina Megumi Kasuya.

The immuno-dot blot technique was tested and standardized for detection of dengue viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae and mosquitoes homogenates. The experiments were carried out with dengue-reactive human sera and with anti-dengue polyclonal antisera prepared in New Zealand male rabbits immunized with DEN-1 (Hawaii) and DEN-2 (New Guinea) purified virus suspensions emulsified in Freund incomplete adjuvant. Results showed that the virus can be easily detected by immuno-dot blot in *A. aegypti* and *A. albopictus* larvae and mosquitoes homogenates and suggest that this technique, for its simple procedure and easy reading, could be useful for field virus detection. Although it was recently established that these viruses can multiply in *A. albopictus* larvae, it is not known whether *A. albopictus* can indeed vector the DEN-1 and DEN-2 viruses in Brazil and, if so, under what percentages, relatively to *A. aegypti* mosquitoes. This study provides a tool for broader epidemiological studies of these viruses.

INTRODUÇÃO

A dengue é atualmente a arbovirose de maior importância mundial, pois 2,5 bilhões de indivíduos encontram-se expostos ao risco de infecção por esta doença, em mais de 100 países de clima tropical e subtropical. No Brasil, a doença foi registrada pela primeira vez, com o isolamento dos sorotipos DEN-1 e DEN-4, durante a epidemia de Boa Vista, Roraima, em 1981. Somente em 1986 a dengue se tornou um problema de saúde pública nacional, com a introdução do sorotipo DEN-1 no estado do Rio de Janeiro e sua subsequente distribuição para vários outros estados do país. A constatação do sorotipo DEN-2 no Estado do Rio de Janeiro, em 1990, mostrou que é ainda mais grave a situação da doença no país. O isolamento recente do sorotipo DEN-3 no município de Nova Iguaçu, em janeiro de 2001, aumentou a preocupação das entidades de saúde pública para o risco de aumento dos casos de febre hemorrágica da dengue.

As técnicas sorológicas são as preferidas no diagnóstico laboratorial das infecções humanas. Para a dengue, as mais comumente utilizadas têm sido MAC-ELISA, inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e teste de neutralização. Estas técnicas se baseiam na detecção de anticorpos antidengue no soro humano. Técnicas de isolamento viral são pouco utilizadas no diagnóstico porque são mais trabalhosas e exigem mais tempo para

execução. As técnicas moleculares são mais utilizadas na pesquisa científica, pois apesar de sua alta sensibilidade e especificidade, os seus custos ainda são elevados para emprego rotineiro no diagnóstico.

Pesquisadores detectam o vírus dengue a partir de *pool* de mosquitos *Aedes aegypti* pelas técnicas de isolamento viral, como cultura de células de *Aedes albopictus* ou primatas (células Vero); técnicas sorológicas, como os ELISA; e técnicas moleculares, como RT-PCR. Há grande interesse em se viabilizar técnicas de alta sensibilidade e de baixo custo para a realização de estudos epidemiológicos da doença.

Immuno-dot blot tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de doenças diversas. É técnica relativamente simples e de baixo custo, pois não requer equipamentos sofisticados nem para a execução e nem para a aferição dos resultados, em que a interpretação dos mesmos é visual. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de testar a viabilidade do uso da técnica de *immuno-dot blot*, na detecção de partículas virais da dengue em homogenatos de mosquitos e de larvas de *A. aegypti* e de larvas de *A. albopictus*, trabalhando-se em separado as duas espécies, com vistas à sua adaptação para uso em campo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dengue acomete anualmente 100 milhões de pessoas em 100 países de todos os continentes, exceto a Europa. Ainda segundo a OMS, cerca de 550 mil doentes necessitam anualmente de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A dengue é hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui sério problema de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais (Figura 1). Em decorrência do crescimento global da população, urbanização, distribuição e favorecimento da propagação do principal mosquito vetor, *Aedes aegypti*, a dengue é uma doença emergente com co-circulação de diferentes sorotipos do vírus, o que aumenta a frequência de epidemias e introduz a febre hemorrágica da dengue (PINHEIRO & DA ROSA, 1991; LEITMEYER et al., 1999).

A dengue é uma doença febril aguda, cujo agente etiológico é um vírus classificado em *Flavivirus*, família Flaviviridae (NOGUEIRA et al., 2000). São conhecidos atualmente quatro sorotipos antigenicamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (SABIN, 1952; HAMMON et al., 1960). O vírus da dengue é um arbovírus e o termo arbovírus deriva da expressão “arthropod-borne viruses”, ou seja, são vírus que se multiplicam nos tecidos de artrópodos hematófagos, e que pela sua picada são transmitidos a vertebrados suscetíveis

(FORRATINI, 1965; PINHEIRO & DA ROSA, 1991). O vírus dengue é esférico, envelopado, com cerca de 40-50 nm de diâmetro e genoma consistindo de fita única de RNA, com polaridade positiva, de aproximadamente 11 kb, que codifica três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (FRANCKI, et al., 1991; FIELDS et al., 1996; MURPHY, et al., 1999). O RNA viral está envolvido pelo capsídeo, constituindo o nucleocapsídeo, com simetria icosaédrica, formado pela proteína C. O nucleocapsídeo é envolvido por uma camada lipídica dupla associada com proteínas de membrana (M) e de envelope (E). A proteína E é a principal proteína estrutural e está diretamente relacionada com a imunidade e virulência dos diferentes sorotipos (WEI et al., 2003).



FIGURA 1 – Distribuição do mosquito *Aedes aegypti* no mundo (Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Em 1986, o Instituto Oswaldo Cruz confirmou a primeira epidemia de dengue no Brasil, na região do Rio de Janeiro (SCHARTZMAYR et al., 1986). O vírus isolado foi caracterizado como sorotipo 1 (DEN-1). Quatro anos depois, um caso de dengue pelo sorotipo 2 (DEN-2) ocorreu na mesma área (NOGUEIRA et al., 1990) e o aumento da virulência foi observado em alguns

poucos casos. Em janeiro de 2001, no município de Nova Iguaçu, o sorotipo DEN-3 foi isolado de uma mulher de 40 anos apresentando sinais e sintomas da dengue clássica (NOGUEIRA et al., 2001). A introdução de mais um sorotipo do vírus no território brasileiro aumenta a probabilidade de ocorrência de casos de febre hemorrágica da dengue.

Em 2003, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde, indicava até o mês de novembro, 299.330 casos notificados de dengue (Tabela 1) (FUNASA, 2003). Houve redução no primeiro semestre, de 61,9%, quando comparado ao mesmo período de 2002 (Tabela 2). Neste mesmo período foram confirmados 616 casos de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (DHF/DSS) em 19 estados, com 42 óbitos confirmados devido a DHF/DSS. Até agosto de 2003 houve circulação autóctone dos sorotipos 1, 2 e 3 em 22 unidades da federação (Figura 2).

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde aumentou significativamente os repasses de verbas para o combate à dengue. De 1996 até 2001, os recursos federais destinados a estados e municípios totalizaram cerca de R\$ 2,5 bilhões. Em 1996, foram R\$ 188,6 milhões; em 1997, R\$ 431 milhões; em 1998, R\$ 396,5 milhões; em 1999, R\$ 448,5 milhões; em 2000, R\$ 456,2 milhões; em 2001, R\$ 605,7 milhões. Para 2002, os recursos foram de R\$ 1 bilhão, quase o dobro do ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Nas Américas, o vírus da dengue persiste na natureza mediante o ciclo de transmissão homem–*A. aegypti*–homem. *Aedes albopictus*, já presente nas Américas e com ampla dispersão na região Sudeste do Brasil (Figura 3), é o vetor de manutenção da dengue na Ásia. Este mosquito foi pela primeira vez associado à transmissão da dengue nas Américas durante um surto da doença no México (IBANEZ-BERNAL et al., 1997), onde mosquitos estavam naturalmente infectados pelo vírus da dengue. Atualmente, sabe-se que outros mosquitos podem vir a ser transmissores potenciais da dengue, pois o vírus já foi isolado de outras espécies de *Aedes*, como o *A. albopictus*, *A. scutellaris*, *A. africanus*, *A. leuteocephalus*, *A. opok*, *A. taylori*, *A. furcifer*, *A. mediovattus* e o *A. polynesiensis* (DIETZE, 1991, ANTUÑANO & MOTA, 2000; FIGUEIREDO & FONSECA, 2002).

A disseminação do *A. aegypti* e da febre amarela no Brasil ocorreu a partir dos portos onde atracavam os navios originários do continente asiático. Ocorreram diversas epidemias, a primeira das quais relatada em Recife, ainda no século XVI. Pelo mesmo mecanismo e possivelmente por transporte aéreo, o *A. albopictus* espalhou-se do Sudeste Asiático para todo o mundo tropical nos últimos anos, tendo sido reconhecido no Brasil em 1987, nas proximidades do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR, 2001, NEVES, 1998). No entanto essa espécie de mosquito, *A. albopictus*, ainda não foi reconhecida como transmissora do vírus dengue no Brasil (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

TABELA 1 – Números de casos notificados de dengue clássica, febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue e óbitos, por mês e região, Brasil, 2003⁽¹⁾.

Região	JAN	FEV	MAR	ABR	MAIO	JUN	JUL	AGO	SET	MI ⁽²⁾	TOTAL	DHF/DSS		Sorotipos
												casos	óbitos	
Brasil	31.473	55.958	69.212	64.968	37.936	18.633	11.141	5.939	2.608	1.106	299.330	616	42	1, 2 e 3
Norte	4.348	5.487	4.044	3.479	2.600	1.834	2.818	3.310	1.479	0	29.467	58	2	1, 2 e 3
Nordeste⁽⁴⁾	11.337	24.034	30.960	37.721	26.077	13.960	6.930	2.117	868	307	151.513	380	30	1, 2 e 3
Sudeste⁽⁴⁾	9.213	18.187	23.541	17.071	6.982	1.868	709	230	29	746	78.576	118	3	1, 2 e 3
Sul⁽³⁾⁽⁴⁾	877	2.299	4.370	1.746	168	22	18	20	15	53	9.589	2	2	1, 2 e 3
Centro-Oeste	5.698	8.951	6.297	4.951	2.109	949	666	262	217	0	30.185	58	5	1, 2 e 3

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde em FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - <http://www.funasa.gov.br>.

1. Dados parciais até novembro de 2003. Sujeitos à alteração.

2. Mês ignorado.

3. Casos importados nos estados de SC e RS.

4. Casos confirmados nos estados de CE, PR e SP.

TABELA 2 – Número de casos notificados de dengue clássica entre janeiro e agosto, por região do Brasil, entre 2002 e 2003.

Região	Janeiro – Agosto	Janeiro – Agosto	Diferença (%)
	2002	2003	
Brasil	768.041	292.599	-61,90
Norte	24.264	27.393	12,90
Nordeste⁽²⁾	283.766	148.076	-47,82
Sudeste⁽¹⁾	378.696	77.801	-79,76
Sul⁽¹⁾	7.442	9.521	27,94
Centro Oeste	73.873	29.808	-59,65

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde em FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - <http://www.funasa.gov.br>.

1. Casos confirmados autóctones nos estados de SP e PR
2. Casos confirmados no estado do CE

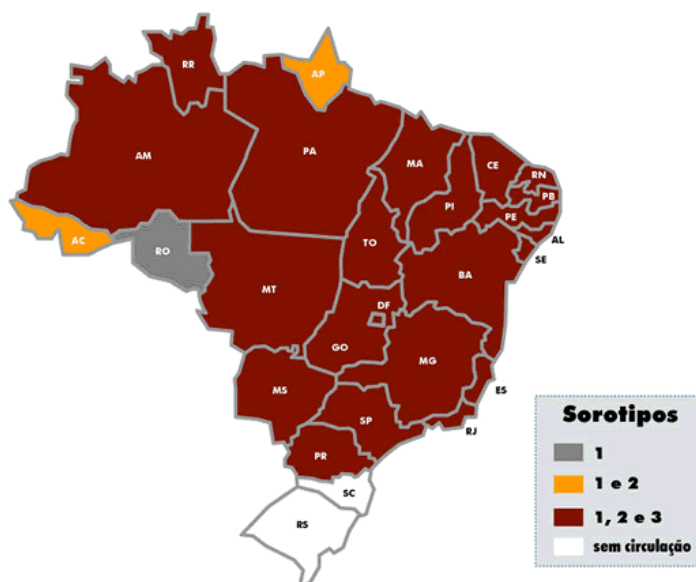


FIGURA 2 – Sorotipos circulantes do vírus da dengue por estados brasileiros até o mês de agosto de 2003 (Fonte: FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - <http://www.funasa.gov.br>).



FIGURA 3 – Municípios que registraram a presença de *Aedes albopictus* no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2002. Dados do Sistema de Informação em Febre Amarela e Dengue/FUNASA e informações complementares (Fonte: DEGALLIER et al., 2003).

Com a presença do *A. aegypti* nas áreas endêmicas de febre amarela, nas regiões Centro-Oeste e Norte, o risco de surgimento de infecções nas regiões urbanas se tornou uma realidade a ser enfrentada. A dengue constitui hoje a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos. Foram notificados no Brasil mais de um milhão de casos nos últimos anos, desde a epidemia de 1981/1982, em Roraima, e a primeira grande epidemia de 1986, no Rio de Janeiro. A partir de então, a doença, acompanhando a expansão do *A. aegypti*, implantou-se igualmente em praticamente todo o Brasil, com a presença dos sorotipos 1, 2 e 3 (SCHATZMAYR, 2001).

Permanece controverso se *A. albopictus* é ou não espécie vetora do vírus. Evidências recentes mostram que o vírus da dengue pode ser transmitido verticalmente por esta espécie na natureza, mas nenhum dado demonstrou-o como vetor entre seres humanos (SERUFO et al., 1993; DEGALLIER et al., 2003). A transmissão vertical do vírus da dengue para uma linhagem brasileira de *A. albopictus* foi comprovada em experimentos laboratoriais, mas o isolamento do vírus da dengue tipo 1, de larvas de *A. albopictus* na região de

Campos Altos, Minas Gerais, Brasil, representa o primeiro isolamento do vírus em larvas naturalmente infectadas (SERUFO et al., 1993).

Aedes aegypti é inseto urbano, cuja fêmea se alimenta essencialmente de sangue humano (DIETZE, 1991), apresenta coloração escura, quando comparado com o *Aedes albopictus*, com faixas brancas. No dorso do *Aedes aegypti*, há um desenho em forma de lira, que desaparece nos insetos mais velhos, sendo substituído por dois tufos de escamas branco-prateadas, enquanto o *Aedes albopictus* apresenta uma faixa central no dorso (Figura 4).



Figura 4 – Aspecto do dorso de *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B)
(Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A detecção e a diferenciação dos sorotipos do vírus da dengue podem ser feitas mediante anticorpos monoclonais em ensaio de imunofluorescência indireta, como proposto por HENCHAL *et al.* (1982).

O diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue tem sido realizado com quatro técnicas sorológicas, a saber: a inibição de hemaglutinação, fixação do complemento, teste de neutralização e MAC-ELISA (“IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay”, ELISA para captura de IgM). Estes testes apresentam limitações, como a ocorrência de reações cruzadas com outros flavivírus e até mesmo vírus de outras famílias, causadores de infecções semelhantes (DE PAULA, 2001; MENDES, 2000).

Durante muitos anos a hemaglutinação foi a técnica mais utilizada, em decorrência da sua sensibilidade e facilidade de execução. A fixação do complemento apresenta sensibilidade baixa e requer pessoal treinado, não sendo mais utilizada para diagnóstico de rotina (DE PAULA, 2001). A técnica sorológica mais específica é a de neutralização, utilizada para identificação do

vírus e sorotipagem, além de definição dos subgrupos intimamente relacionados (CALISHER et al., 1989).

O ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) tem sido muito utilizado no diagnóstico de viroses, entre as quais as denominadas arboviroses (ROEHRIG, 1982). Nos ELISA, o suporte físico para a fixação do antígeno ou do anticorpo é a microplaca de poliestireno (CONVERSE e MARTIN, 1990). No início da técnica realiza-se a adsorção das moléculas ou partículas de antígeno a serem pesquisadas, e presentes na amostra, na matriz da microplaca de poliestireno (SHUAI et al., 1986). Usualmente a dengue é diagnosticada pela constatação da imunoglobulina M (IgM), antivírus da dengue, sendo esta variação do ELISA denominada MAC-ELISA (TALARMIN et al., 1998).

O *immunoblot* é um procedimento enzimático utilizado para detectar, por exemplo, anticorpos humorais contra uma proteína específica de vírus (HARLOW & LANE, 1988). Há várias variações desta técnica, mas as mais utilizadas para diagnóstico são *Western blot* e *dot blot*. No *dot blot*, um antígeno da partícula viral, que já tenha sido isolado e purificado a partir do vírus ou do hospedeiro contaminado, é primeiramente aplicado na matriz de náilon ou nitrocelulose. A técnica é semiquantitativa permitindo somente determinar o título do anticorpo ou antígeno, sem determinar a concentração (HAWKES et al., 1982; BANTTARI & GOODWIN, 1985).

No diagnóstico, membranas de nitrocelulose têm-se mostrado eficazes como matrizes adsorventes em substituição às microplacas da ELISA. Com elas, a técnica tem execução mais simples, não requer tratamento da amostra de antígeno para a sua fixação. Os ensaios imunoenzimáticos realizados em membranas de nitrocelulose são chamados de *immuno-dot blot* (MATTA et al., 1997), dot-ELISA (BANTTARI & GOODWIN, 1985; PAPPAS et al., 1984; PAPPAS et al., 1986; SMITH, 1987, MANCIANTI et al., 1996) ou *dot immunobinding assay* (HAWKES et al., 1982; SHERWOOD et al., 1987).

Immuno-dot blot apresenta alta eficiência na detecção de vírus, anticorpos e bactérias em amostras diversas (XU et al., 1989; RODRIGUE et al., 1989; OLIVEIRA, 1995; DRACZ, 1996; MATTA et al., 1997; HENRIQUES & MEZENCIO, 2001). A técnica foi utilizada por XU et al. (1989) para detectar

anticorpos ao HIV em indivíduos soropositivos e soronegativos, tendo a sua sensibilidade sido equiparada ao micro ELISA e ao *Western blot*.

OLIVEIRA (1995) avaliou o potencial da técnica de *immuno-dot blot* na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. Verificou que a especificidade dos anticorpos contra essa bactéria foi semelhante à observada nos testes de aglutinação, onde os anticorpos reagiram positivamente com todos os isolados em teste. A sensibilidade da técnica, em que se empregou o procedimento de captura do antígeno, foi de 10^5 UFC/ mL.

O *immuno-dot blot* é considerado teste inovador no diagnóstico do vírus da síndrome da cabeça inchada (SCI), por ser barato e rápido, acessível para uso por países em desenvolvimento, uma vez que não depende da existência de infra-estrutura laboratorial (LIMA, 1998). A mesma sensibilidade do ELISA em detectar 100% das amostras positivas foi observada no *immuno-dot blot*, contudo esta técnica apresenta-se melhor quanto aos valores de especificidade, 96%, enquanto o ELISA apresentou 93%.

O *immuno-dot blot* também foi utilizado na detecção de anticorpos para o vírus da doença infecciosa bursal, quando se observaram como principais vantagens a possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo e dispensar o uso de equipamentos de leitura de alto custo (BARROS, 2001). O teste é de fácil execução, rápido, sendo possível utilizá-lo em campo. Além disso, os discos com os resultados podem ser conservados, na ausência de luz, por tempo indeterminado.

RODRIGUE *et al.* (1989) comparou a técnica de *immuno-dot blot* com *immuno-colony-blot*, microimunofluorescência indireta e emprego de meio seletivo na detecção de bactérias da cavidade oral de camundongos. Os resultados do *immuno-dot blot* foram comparáveis em 91% com os auferidos com as outras técnicas; e, contudo, *immuno-colony-blot* mostrou-se de todos o mais sensível para a finalidade de detectar e diferenciar as espécies de bactérias presentes nas amostras.

Ao utilizar *immuno-dot blot* para constatar adulteração de leite pela adição de soro de queijo, DRACZ (1996), empregando anti-soro policlonal com

título de 960, verificou que é grande a sensibilidade da técnica, com a qual foi possível constatar até 1% (v/v) de soro de queijo adicionado ao leite.

HENRIQUES & MEZENCIO (2001), utilizando *immuno-dot blot* para detectar o vírus Mayaro em homogenatos de mosquitos do gênero *Haemagogus*, verificaram que não ocorreu reação cruzada do anti-soro antidengue contra o vírus Mayaro e nem do anti-soro produzido em coelhos, para o vírus Mayaro, contra o vírus da dengue; desta forma, a técnica pode ser utilizada no diagnóstico diferencial das duas doenças, o que é muito vantajoso, porque ambas apresentam sintomas muito semelhantes.

A membrana de nitrocelulose é suporte excelente para sistemas de imunodeteccção, pois apresenta alta capacidade de ligação com proteínas (PALFREYMAN et al., 1988). Há grande interesse no uso possível de *immuno-dot blot* para a produção de “kits” diagnósticos para a dengue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997), uma vez que através desta técnica não haveria necessidade de adquirir equipamentos caros para se obterem os resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local da pesquisa

O estudo foi conduzido no Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2. Cultura de células

Células de *Aedes albopictus*

O clone de células de mosquitos, C6/36 *Aedes albopictus*, foi gentilmente cedido pelo Prof. Moacyr Alcoforado Rebello, do IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. As células foram mantidas a 28°C em garrafas de plástico com 25 cm² de superfície interna útil, em meio líquido DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”) Gibco® suplementado com 0,25% p/v de bicarbonato de sódio, 500 U/mL de penicilina,

100 µg/mL de estreptomicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B e 10% v/v de soro fetal bovino. Após a confluência total da cultura, o meio foi removido e as células lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) e, a seguir, repicadas utilizando-se solução de tripsina a 0,25% p/v em PBS, com posterior ressuspensão das células em meio de cultura e passagem para três outras novas garrafas do mesmo tamanho (25 cm²). As culturas foram incubadas em estufa a 26°C e utilizadas para o isolamento viral (MEZENCIO et al.,1989, 1990).

Células VERO

As culturas de células VERO foram mantidas em garrafas de vidro (33cm²) ou de plástico (25 cm²), a 37°C em meio MEM (“Modified Eagle Medium”) Gibco® suplementado com 0,25% de bicarbonato de sódio, 7% de soro fetal bovino, 500 UI/mL de penicilina; 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. Após a confluência das células elas foram lavadas com uma solução de verseno e repicadas para outras garrafas, utilizando-se de uma solução de tripsina-verseno a 0,25% para posterior ressuspensão das células em meio de cultura e passagem para três outras novas garrafas do mesmo tamanho. As culturas foram incubadas a 37°C e utilizadas após a confluência das células em uma monocamada.

3. Vírus

As amostras de vírus dengue, sorotipos DEN-1 e DEN-2, coletadas do sobrenadante de centrifugação de células infectadas de *A. albopictus*, multiplicadas em meio Leibovitz Gibco®, foram gentilmente doadas pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Foram acondicionadas em vidros do tipo “penicilina” com vedação de borracha e mantidas em ultracongelador a - 80°C.

4. Multiplicação do vírus dengue

A multiplicação do vírus dengue foi realizada em cultura de células *A. albopictus* (C6/36) iniciando-se o procedimento como o descarte do meio de cultura no qual as células cresceram e substituindo-o por novo meio DMEM desprovido de soro fetal bovino e em quantidade suficiente apenas para cobrir a monocamada de células. Cerca de 250 μ L de cada amostra viral, de DEN-1 e DEN-2, separadamente, foram adicionados em cada garrafa contendo a monocamada celular completa. Efetuada a inoculação, as garrafas foram incubadas por 60 minutos, a 28°C, sob agitação manual ocasional, feitas com intervalos de 5 minutos. Em seguida, o meio foi descartado, e adicionado novo volume do meio completo de manutenção (DMEM suplementado com 0,25% p/v de bicarbonato de sódio, 500 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino). As garrafas foram incubadas a 28°C até a constatação do efeito citopático (ECP), observado com ajuda de microscópio invertido LEITZ DIARVET GERMANY®. O ECP causado pelo vírus consiste na fusão do citoplasma das células infectadas, com o desaparecimento das suas membranas celulares, decorrendo daí que os núcleos ficam imersos no citosol; vacúolos surgem, sendo formados os sincícios. O mesmo procedimento foi adotado com células sem a inoculação viral, tendo sido adicionado somente o meio de manutenção; constituiu-se, desta forma, a testemunha ou controle.

Uma vez constatado o efeito citopático, o meio de cultura e as células foram coletados e submetidos à centrifugação a 7800 g, a 4°C, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. O sobrenadante, consistindo do meio e as partículas virais, foi recolhido e repartido, em iguais volumes, em pequenos frascos. As amostras da solução viral foram mantidas em congelador a -80°C (MEZENCIO et al., 1989, 1990).

5. Titulação de DEN-1 e DEN-2

A titulação dos dois sorotipos do vírus dengue foi feita pelo método de TCID_{50%} (dose infectante de 50% em cultura de células VERO) e a determinação do título da suspensão viral pelo método de REED & MUENCH (1938). As garrafas contendo as células VERO recém-confluentes foram selecionadas e os seus meios descartados. As células foram tripsinizadas e 5 mL de meio MEM foram adicionados. As células foram ressuspensas e 4 mL da suspensão foram transferidos para tubo FALCON[®]. As células foram diluídas em mais 8 mL de meio MEM, para se dispor de 10⁶ células em cada placa de microtitulação com 96 orifícios. A seguir foram transferidos 50 µL da suspensão de células VERO (4,2 X 10³ células/orifício) para cada poço da placa de poliestireno, com 96 cavidades. As amostras dos sorotipos do vírus foram então diluídas em meio MEM não suplementado e 50 µL das diluições virais foram colocados junto às células. As microplacas foram incubadas em incubadora tipo BOD, a 37°C com 5% de CO₂, por até 72 horas. As células foram observadas em microscópio invertido, durante esse período, aguardando-se o efeito citopático.

6. Purificação do vírus dengue

A purificação dos sorotipos do vírus dengue foi feita conforme protocolo gentilmente cedido pelo Prof. Maulori Cabral do Laboratório de Estruturas de Superfície de Vírus Envelopados e Interferons, IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. Assim, cerca de 90 mL de sobrenadante de culturas de células infectadas foram recolhidos e se lhe adicionou (q.s.p.) solução de tampão tris - EDTA sódico até a concentração final de 2 mM, em pH 8,4. A mistura foi centrifugada a 7800 g por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante separado do sedimento e a ele adicionado NaCl até a concentração final de 0,5 M. A mistura foi mantida sob agitação por meia hora, seguindo-se adição de

polietilenoglicol (PEG) 6000, a 40%, em água, até a concentração final de 8% p/v. A mistura foi mantida em banho de gelo por uma noite e centrifugado a 2000 g por 30 minutos. O sedimento foi imediatamente ressuspenso em solução de tris 2 mM/ EDTA a 1 mM, contendo 10 % p/v de sacarose, em volume equivalente a 1/25 vezes o inicial. O material foi mantido no gelo por uma hora e novamente centrifugado a 6000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi aplicado no topo de um gradiente de densidade contínuo, 20 a 45% p/v, de tartarato de sódio e potássio, em tampão PBS-glicerol 8% v/v e centrifugado em ultracentrífuga Beckman a 150.000 g por duas horas, rotor SW 50.1. A banda obtida, contendo vírus, foi coletada com micro-seringa e agulha, e em seguida foi dialisada contra tampão PBS-glicerol a 8% v/v por uma noite. Os frascos dos vírus purificados foram rotulados e guardados em ultracongelador a -80°C (MEZENCIO et al., 1993).

7. Preparo do adjuvante incompleto de Freund

Óleo mineral e lanolina participam, na proporção de 1:1, da composição do adjuvante incompleto. A lanolina, juntamente com o óleo mineral, foi transferida para gral de porcelana previamente aquecido em estufa. A mistura, após homogeneização cuidadosa e completa, foi dividida em alíquotas e acondicionada em frascos limpos. O armazenamento do adjuvante foi feito em congelador, regulado para -20° C. A alíquota foi posteriormente aquecida, quando da utilização do adjuvante.

8. Preparo do imunógeno

A solução de vírus purificado com título de 10^5 , TCID_{50%}, foi emulsificada 1:1 v/v com adjuvante incompleto de Freund. A emulsificação foi feita usando-se seringa de injeção, sem agulha, em que a mistura foi aspirada e dispensada

seguidamente, até se chegar ao aspecto branco, viscoso e denso da emulsão, quando uma gota desta não se desfaz de imediato em contato com água.

9. Obtenção dos anti-soros

Foram utilizados coelhos machos da raça Nova Zelândia, com a idade de 2 a 3 meses no início das injeções. Coletaram-se 10 mL de sangue de cada coelho, antes da imunização, de forma a se ter o soro pré-imune, ou normal. Os coelhos foram imobilizados e aplicou-se por vez, por via intramuscular, 1,0 mL do emulsificado, solução viral-adjuvante incompleto de Freund. As injeções seguintes foram ministradas com intervalos de 15 a 20 dias, e todas juntas perfizeram mês e meio. Após esse período, sacrificaram-se os animais. O sangue foi coletado de uma só vez em béquer, este foi transferido para refrigerador onde permaneceu até a manhã seguinte, para que se completasse a separação entre o soro e o coágulo. O coágulo foi mantido à parte com bastão de vidro, até que todo o soro fosse vertido em tubos de centrifuga. Os anti-soros foram centrifugados a 2500 g, por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. O sobrenadante foi coletado e alíquotas de 500 µL foram armazenadas em vidros do tipo “penicilina” com vedação de borracha e mantidas congeladas a -20°C até quando necessário utilizar uma das alíquotas disponíveis (MEZENCIO, 1981).

Amostras de soro humano reativo para dengue foram gentilmente cedidas pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) para a realização dos controles positivos quando da utilização da técnica.

10. Coleta de mosquito e larvas

Mosquitos e larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* e suas larvas foram coletados e identificados pelos técnicos da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), regional de Ubá, MG. Após a coleta foram colocados em

recipientes devidamente rotulados, indicando o local e a data, sendo em seguida congelados a -20°C . Foram obtidas 67 larvas de *A. aegypti*, 17 mosquitos *A. aegypti* e 60 larvas *A. albopictus*.

11. Preparo de sobrenadante oriundo de larvas ou mosquitos macerados

As amostras de mosquitos e larvas congelados foram triturados em almofariz, na presença de 2 mL de diluente estéril contendo meio DMEM suplementado com 0,25% de bicarbonato de sódio p/v, 500 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B e 10% v/v de soro fetal bovino. A suspensão foi submetida a 7800 g, por 30 min, em centrífuga Eppendorff[®]. O fluido sobrenadante coletado foi utilizado a seguir no estudo de detecção do vírus pela técnica de *immuno-dot blot* (OLIVEIRA et al., 1994; DRACZ, 1996; HENRIQUES & MEZENCIO, 2001).

12. Immuno-dot blot

Os discos de nitrocelulose de 6,0 mm de diâmetro, obtidos de membranas produzidas pela Bio-Rad[®], com 0,45 μm de diâmetro de poro, foram utilizados como suporte sólido, foram colocados em microplacas de poliestireno, CORNING[®], com 96 orifícios contendo esferas de vidro de aproximadamente 4 mm de diâmetro um disco por cavidade. Os discos foram sensibilizados com 2 μL de uma das diluições seriadas dos homogenatos de larvas e mosquitos *A. aegypti* e de larvas de *A. albopictus*, preparadas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, tendo, a seguir, sido deixados à temperatura ambiente, para secar.

Para bloqueio de sítios do disco não ocupados pelo vírus, as placas contendo os discos de nitrocelulose sensibilizados foram incubadas sob

agitação constante (180 rpm), à temperatura ambiente, durante 10 minutos, com 250 μ L albumina bovina a 2% p/v em PBS (tampão salina fosfato) pH 7,0 contendo 0,05% v/v de *Tween* 20 (PBST a 0,05%). A solução bloqueadora foi então removida usando-se bomba de vácuo. Em seguida foi feita uma lavagem com 250 μ L de PBST a 0,05%, por 10 minutos, sob agitação, em temperatura ambiente.

Cada disco recebeu 250 μ L de cada diluição, em PBST a 0,05%, de anti-soro obtido de coelho, preparado contra antígenos virais. A incubação desses discos com os anti-soros foi por 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente, seguindo-se de três lavagens com 250 μ L de PBST 0,05%, por 10 minutos, para cada lavagem.

Após as lavagens, foram adicionados, por cavidade, 250 μ L de imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-IgG de coelho, conjugada com peroxidase, e diluída a 1:5000 em PBST a 0,05%. A incubação transcorreu em temperatura ambiente, também sob agitação, por 50 minutos. Seguiram-se duas lavagens com 250 μ L de PBST a 0,05%, 10 minutos cada, sob agitação, em temperatura ambiente.

A cada disco, foram adicionados 100 μ L do substrato, constituído por 0,1% (p/v) de 3,3-diaminobenzidina (SIGMA[®]); Tris-HCl a 50 mM, pH 7,6; 1,0% de cloreto de níquel (SIGMA[®]) e 0,1% (v/v) de peróxido de hidrogênio (MERCK[®]). As placas foram incubadas durante 5 a 10 minutos, ou até que o controle positivo pudesse ser evidenciado. A reação foi interrompida com 200 μ L de água destilada e deionizada. Cada disco foi lavado com 250 μ L de PBST a 0,05% e deixados em estufa a 35°C até a seca completa. Os resultados foram avaliados visualmente, positivos ou negativos, com base na presença ou ausência de uma mancha central (partículas do vírus) de cor marrom nos discos de nitrocelulose, sendo esta o produto da catálise exercida pela peroxidase no substrato diaminobenzidina. O precipitado marrom não se verifica nas amostras negativas porque o antígeno está ausente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A especificidade sorológica dos anti-soros de coelhos imunizados com vírus DEN-1 e DEN-2, e dos soros humanos reativos para dengue encontra-se demonstrada nas figuras 5 e 6. A técnica de *immuno-dot blot* possibilita a detecção de níveis baixos de anticorpos, em comparação com os outros testes sorológicos, como, por exemplo, a imunofluorescência indireta (HARLOW & LANE, 1988).

O título obtido para o anti-soro de coelho imunizado com vírus DEN-1 foi 32 vezes menor que aquele constatado no soro humano reativo para dengue, enquanto o anti-soro de coelho imunizado com vírus DEN-2 foi 16 vezes menor (Figuras 7, 8 e 9). Em razão destes resultados infere-se que para o melhor aproveitamento desses anti-soros com baixo título, a concentração e purificação da IgG dos anti-soros de coelhos deverá ser boa alternativa. É sabido que o uso de anticorpos monoclonais melhora o desempenho dos anticorpos nos ensaios sorológicos, em razão de sua grande especificidade (HARLOW & LANE, 1988), contudo, esta alternativa não foi estudada.

Discos de nitrocelulose empregados para a adsorção de antígenos têm-se mostrado funcionais, ou bem sucedidos, em vários sistemas de avaliação de complexos antígeno-anticorpo (LIMA, 1998). A clareza dos resultados obtidos no presente estudo demonstram a alta sensibilidade e especificidade da

técnica de *immuno-dot blot* para a detecção de partículas virais da dengue em homogenatos de mosquitos e larvas de *A. aegypti* e larvas de *A. albopictus*.

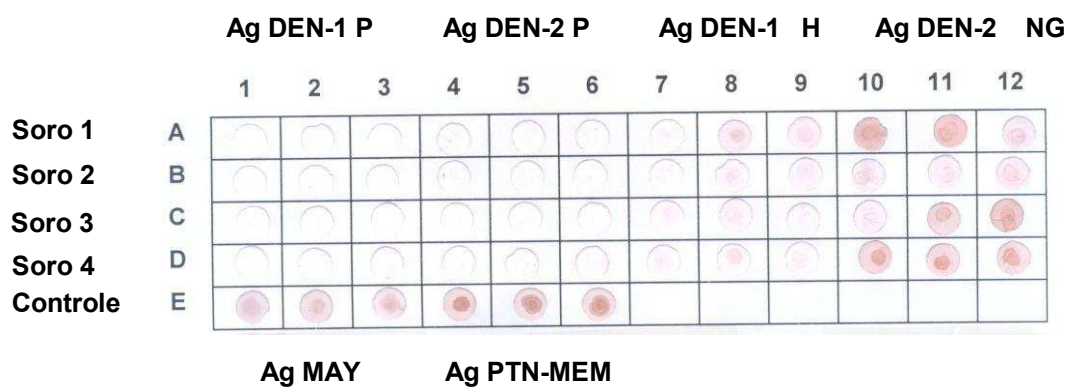


FIGURA 5 – Resultados dos testes de *immuno-dot blot*, comparando a reação dos vírus DEN-1 e DEN-2 purificados (P) com as amostras de vírus DEN-1 (Havaí=H) e DEN-2 (Nova Guiné=NG), amostras sementes. Linha A, B, C e D diferentes amostras de soros humanos reativos para dengue. Linha E controle positivo da reação, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados.

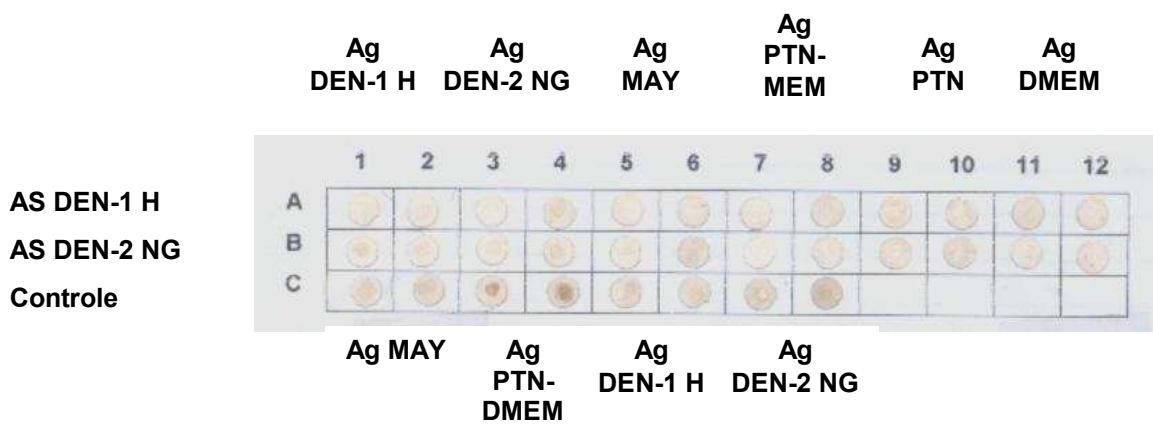


FIGURA 6 – Resultados dos testes de *immuno-dot blot* para os anti-soros de coelhos produzidos para vírus DEN-1 (Havaí) e DEN-2 (Nova Guiné). Linha A anti-soro policlonal de coelho imunizado com DEN-1 (Havaí) (AS DEN-1 H). Linha B anti-soro policlonal de coelho imunizado com DEN-2 (Nova Guiné) (AS DEN-2 NG). Linha C controle positivo da reação; antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-4) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 5-8).

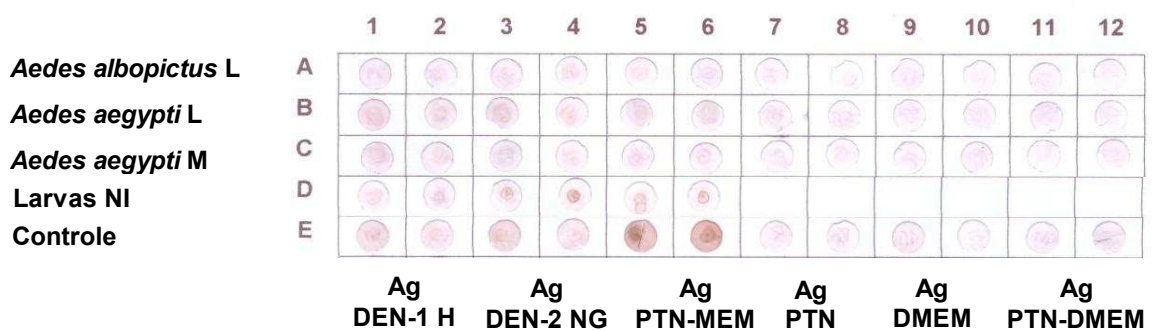


FIGURA 7 – Resultado dos testes de *immuno-dot blot* utilizados para a determinação das menores diluições de soro reativo para dengue. Nas linhas A, B, C e D as colunas de 1-12 representam as diluições 1/2 a 1/4096 dos homogeneizados. Linha E: controles positivos (colunas 1-6) e controles negativos (colunas 7-12), antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 1-4 e 7-12) e com anti-soro de coelho (colunas 5-6).

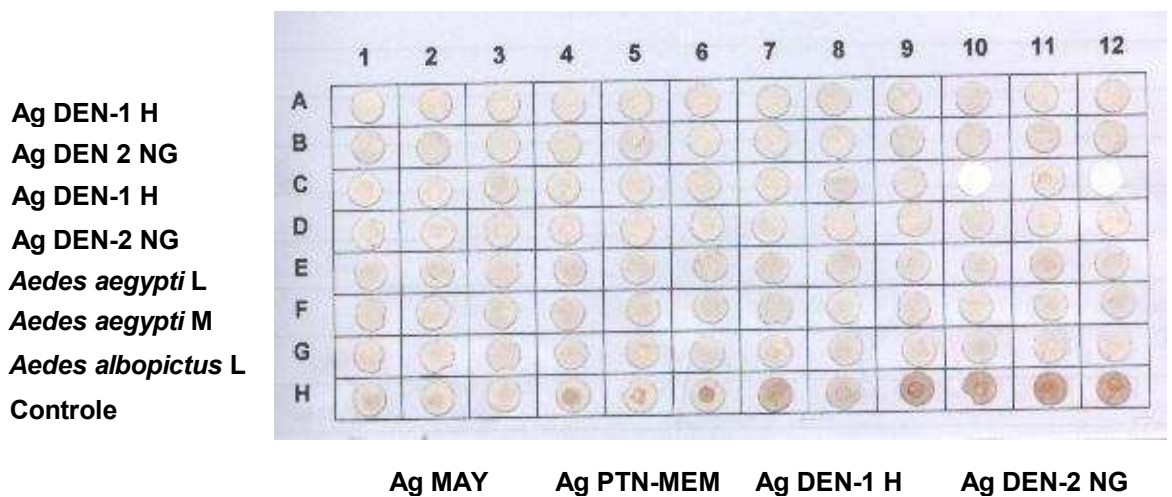


FIGURA 8 – Resultados dos testes de *immuno-dot blot* dos experimentos para verificar as menores diluições dos anti-soros policlonais de coelhos imunizados com vírus DEN-1 (Havaí) e DEN-2 (Nova Guiné). Linhas A, B, E e G diluição seriada do anti-soro policlonal de coelho imunizado com vírus DEN-1 (, 1/2 até 1/2048). Linhas C, D e F diluição seriada do anti-soro policlonal de coelho imunizado com vírus DEN-2 (sem diluir, 1/2 até 1/2048). Linha H controles positivos, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-6) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 7-12).

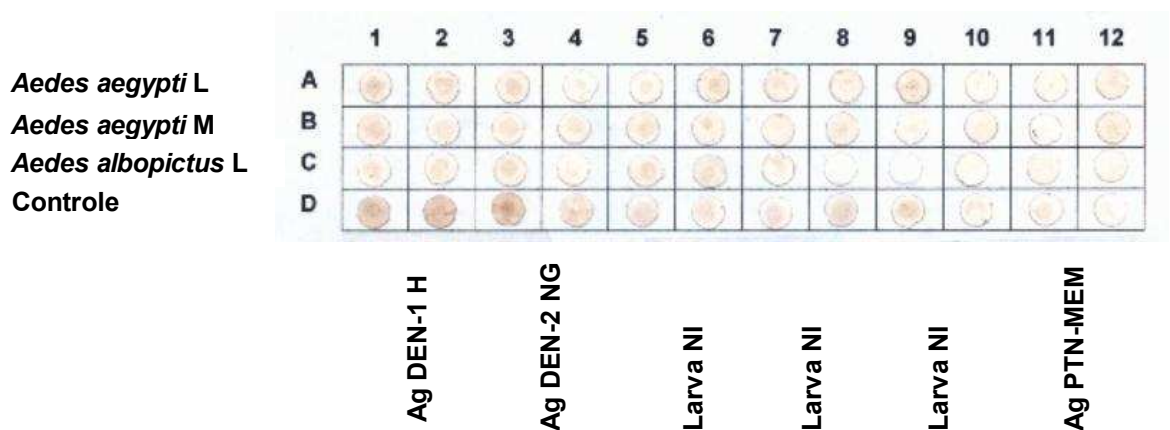


FIGURA 9 – Resultados dos testes de *immuno-dot blot* dos experimentos para verificar a menor diluição dos homogenatos (sem diluir, 1/2 a 1/2048) ao qual o soro humano reativo para dengue reage positivamente. Linhas A, B e C soro humano reativo para dengue diluído 1:32. Linha D controles positivos, antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 1-10) e antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 11-12).

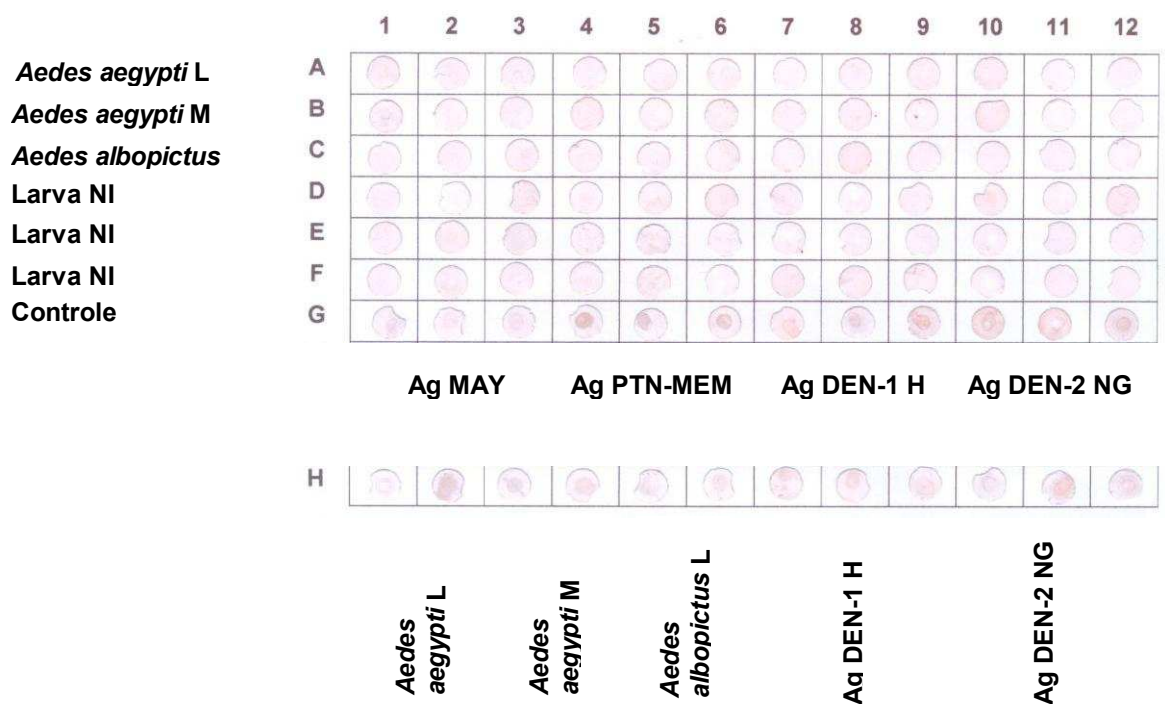


FIGURA 10 – Resultados dos testes de *immuno-dot blot* dos experimentos com vírus DEN-1 não diluído para verificar a menor diluição dos homogenatos (sem diluir, 1/2 a 1/2048) aos qual o anti-soro de coelho é reativo. Linha A, B, C, D, E, F e G anti-soro policlonal de coelho imunizado. Linha G controles positivos, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-6) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 7-12). Linha H soro humano reativo para dengue.

No *immuno-dot blot*, o antígeno está ligado ao disco de nitrocelulose e, portanto, as placas podem ser reutilizadas repetidas vezes, reduzindo o custo operacional do teste. Os resultados são interpretados visualmente, não requerendo mão-de-obra especializada e nem equipamento caro, como espectrofotômetro, para efetuar e interpretar leituras (PAPPAS et al., 1984; 1986).

Os anticorpos obtidos a partir dos anti-soros preparados em coelhos imunizados com partículas virais dos sorotipos DEN-1 e DEN-2 são provavelmente anticorpos do grupo flavivírus reativo ou anticorpos direcionados para complexo específico dengue (Figuras 8, 9, 10 e 11). O anti-soro de coelho imunizado com partículas virais do sorotipo DEN-1 interagiu positivamente tanto ao vírus DEN-1, quanto ao vírus DEN-2 utilizados como controles (Figura 6). O mesmo se verificou com o anti-soro obtido do coelho imunizado com partículas virais do sorotipo DEN-2 (Figura 6). Os anti-soros disponíveis interagiram positivamente com os vírus da dengue, porém ocorreu interação cruzada entre os anti-soros com os vírus para os quais foram produzidos. Não se verificou interação dos anti-soros de coelho com outros antígenos testados que não fossem os vírus para os quais foram produzidos.

O vírus da dengue, à semelhança dos demais flavivírus, apresentam três classes de determinantes antigênicos: grupo comum dos flavivírus, complexo específico e sorotipo específico (TRENT et al, 1976; TRENT, 1977). A diferenciação de determinantes antigênicos do vírus dengue pode ser feita pelo uso da tecnologia dos hibridomas para produzir anticorpos monoclonais, para o uso em ensaio de imunofluorescência indireta (HENCHAL et al., 1982).

Os soros humanos reativos para dengue também interagiram positivamente tanto com as amostras de vírus DEN-1, quanto com as de DEN-2 (Figura 5). Assim, supõe-se que os anticorpos presentes nestes soros sejam do grupo flavivírus reativo ou anticorpos para complexo específico para dengue. Os soros humanos reativos para dengue reagiram positivamente

somente diante das amostras de vírus da dengue e não diante dos demais antígenos testados (Figuras 7 e 9).

Os anti-soros de coelhos imunizados com DEN-1 ou DEN-2 interagiram positivamente diante dos homogenatos de mosquitos e, ou larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Figura 8). Porém, possivelmente em decorrência dos seus baixos títulos, estes anti-soros não interagiram positivamente quando em presença de diluições maiores desses mesmos homogeneizados (Figuras 10 e 11).

Neste estudo a interação positiva dos anti-soros de coelhos imunizados com DEN-1 e DEN-2, bem como dos soros humanos testados com o homogeneizado de larvas de *A. albopictus*, foi assumida como resultado que contribuiu não somente para demonstração de que a técnica em teste, *immuno-dot blot*, se mostrou viável para o objetivo proposto, como também, demonstrou sensibilidade para se detectar a presença de vírus dengue no homogenatos de larvas de *A. albopictus* (Figuras 6 e 12).

As larvas portadoras do vírus da dengue foram pela primeira vez localizadas na região de Campo Altos, MG (SERUFO et al., 1993). Nesse caso, confirmação dos sorotipos foi feita mediante utilização do procedimento padrão da técnica de imunofluorescência e com o emprego de anticorpos monoclonais.

Em razão dos resultados obtidos, empregando anti-soros policlonais, a técnica de *immuno-dot blot* não possibilitou identificar os sorotipos do vírus dengue presentes nos homogenatos. Provavelmente a utilização de anticorpos monoclonais possibilitaria a identificação dos sorotipos, devido à alta especificidade e afinidade desses anticorpos. O uso de anticorpos monoclonais na técnica de *immuno-dot blot* permitiria a montagem de um *kit*, possível de utilização em campo, com distinção dos diferentes sorotipos do vírus dengue.

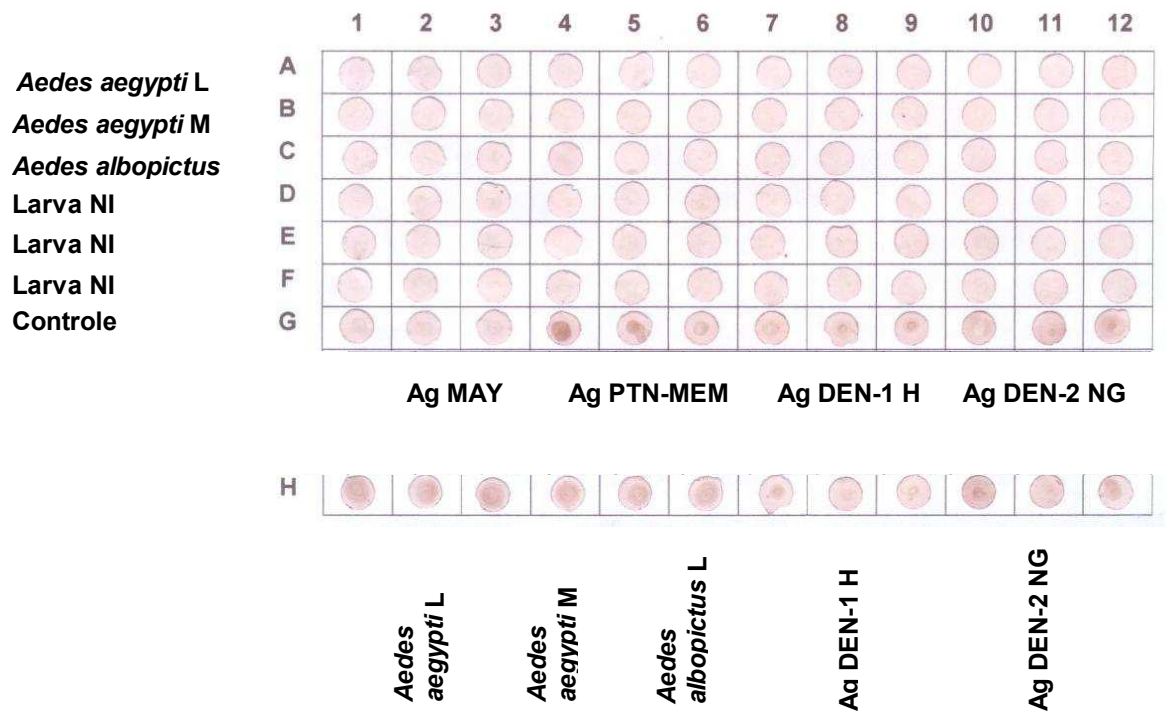


FIGURA 11 – Resultados dos testes de *immuno-dot blot* dos experimentos com vírus DEN-2 diluído 1:2 para verificar a menor diluição dos homogenatos (sem diluir, 1/2 a 1/2048) ao qual o anti-soro de coelho é reativo. Linha A, B, C, D, E, F e G anti-soro policlonal de coelho imunizado. Linha G controles positivos, antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados (colunas 1-6) e antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue (colunas 7-12). Linha H soro humano reativo para dengue.

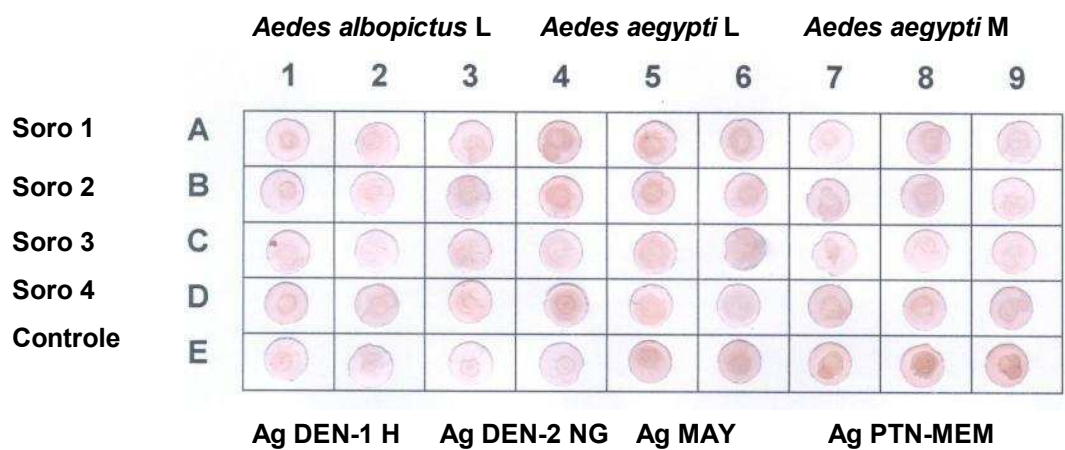


FIGURA 12 – Resultado do teste de *immuno-dot blot* das reações dos homogenatos de larvas de *Aedes albopictus* (*Aedes albopictus* L), e homogenatos de larvas e mosquitos de *Aedes aegypti* (*Aedes aegypti* L e *Aedes aegypti* M, respectivamente), contra soros humanos reativos para dengue. Linha A, B, C e D diferentes amostras de soros humanos reativos para dengue. Linha E controle positivo da reação, antígenos reagindo com soro humano reativo para dengue, colunas 1-4; antígenos reagindo com seus respectivos anti-soros obtidos em coelhos imunizados, colunas 5-9.

RESUMO E CONCLUSÕES

A técnica de *immuno-dot blot* mostrou-se eficiente na detecção do vírus da dengue em homogenatos de larvas e mosquitos *Aedes aegypti* e de larvas de *Aedes albopictus*, sendo utilizados anti-soros policlonais de coelhos imunizados com vírus DEN-1 e DEN-2. Devido ao fato dos títulos dos soros policlonais preparados em coelhos serem baixos, tanto no coelho imunizado com DEN-1 (Havaí) quanto com DEN-2 (Nova Guiné), também foram utilizados, em alguns experimentos, soros humanos reativos para dengue. E, todavia, permanece aberta a alternativa, ainda não estudada, de concentração e purificação prévias destas imunoglobulinas reativas a esses sorotipos, e presentes nos anti-soros de coelhos, antes de empregá-las no teste. As reações cruzadas observadas em *immuno-dot blot*, tanto para DEN-1 quanto para DEN-2, indicam que os anticorpos presentes nos anti-soros policlonais, tanto nos originados de coelhos como nos de origem humana, não são específicos para os sorotipos em estudo. Assim, em futuros trabalhos, o emprego de anticorpos monoclonais restritos ou privativos de cada sorotipo do vírus da dengue poderá permitir a especificidade desejada e ainda maior sensibilidade da técnica de *immuno-dot blot*. Mostrou-se o potencial desta técnica para emprego direto, em campo, visto a possibilidade de avaliação

visual da cor nos discos de membrana; a sensibilidade e o baixo custo em comparação às técnicas tradicionalmente utilizadas.

BIBLIOGRAFIAS

ANTUÑANO, F. J. L. & MOTA, J. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 7, n. 5, p. 285-292, 2000.

BANTTARI, E. E. & GOODWIN, P. H. Detection of potato viruses S, x and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). **Plant Disease**, v.69, n. 3, p. 202-205, 1985.

BARROS, D. M. ELISA e dot-ELISA, para detecção de anticorpos para o vírus da doença infecciosa bursal. Viçosa, MG, UFV, 2001. 59 p. (Tese M. S.)

CALISHER, C. H., KARABATSOS, N., DALRYMPLE, J. M., SHOPE, R.E. & PORTERFIELD, J. S. Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 37-43, 1989.

CONSOLI, R. A. G. B. & OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1 reimpressão. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998. 228 p.

CONVERSE, R. H.; MARTÍN & R. R. ELISA methods for plant viruses. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DEBOER, S., eds. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens-a laboratory manual**. St. Paul, APS Press, p. 179-196, 1990.

DE PAULA, S. O. Uso da reação em cadeia da polimerase para identificação de vírus dengue em sangue, soro e "buffy-coat" e diferenciação dos sorotipos Den-1 e Den-2 por restrição enzimática. Ribeirão Preto, SP, USP, 2001. 81 p. (Tese de M. S.).

DEGALLIER, N.; TEIXEIRA, J. M. S.; SOARES, S. S.; PEREIRA, R. D.; PINTO, S. C. F.; CHAIB, A. J. M.; VASCONCELOS, P. F. C. & OLIVEIRA, E. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemic in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 386-387, 2003.

DIETZE, R. Dengue. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 22, p. 183-188.

DRACZ, S. Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite. Viçosa, MG, UFV, 1996, 63 p. (Tese M. S.).

FIELDS, D. M., KNIPE, P. M. & HOWLEY P. M. **Fundamental virology**. 3 Ed. New York: Lippincott-Raven, 1996. 340 p.

FIGUEIREDO, L. T. M. & FONSECA, B. A. L. Dengue. In: **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 204-217.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. São Paulo: USP, 1965. v. 3. 416 p.

FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L. & BROWN, F. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth report of the International

Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology Supplementum 2**. New York: Springer-Verlag Wien, 1991. 450 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA) – Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em 03/07/2003.

HAMMON, W. McD.; RUDNICK, A. & SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, p. 1102-1103, 1960.

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

HAWKES, R.; NIDAY, E. & GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 119, p. 142-147, 1982.

HENCHAL, E. A., GENTRY, M. K., McCOWN, J. M. & BRANDT, W. E. dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 4, p. 830-836, 1982.

HENRIQUES, D. A. & MEZENCIO, J. M. S. Establishment of ideal parameters to use immunodot blot to verify presence of Mayaro virus in mosquitoes In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu, PR. Livro de resumos, p. 421.

IBANEZ-BERNAL, S.; BRISENO, B.; MUTEBI, J. P.; ARGOT, E.; RODRIGUEZ, G.; MARTINEZ-CAMPOS, C.; PAZ, R.; DE LA FUENTE-SAN ROMAN, P.; TAPIA-CONYER, R. & FLINER, A. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 305-309, 1997.

LEITMEYER, K. C., VAUGHN, D. W., WATTS, D. M., SALAS, R., CHACON, I. V., RAMOS, C. & RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

LIMA, A. M. C. Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e dot-ELISA) para detecção de anticorpos antipneumovírus aviário. Viçosa, MG, UFV, 1998. 47 p. (Tese M. S.).

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F. & POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, p. 1-9, 1996.

MATTA, H, PUNJ, V. & KANWAR, S. S. An immuno-dot blot for detection of thermostable pretease from *Pseudomonas* sp. AFT-36 of dairy origin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 300-302, 1997.

MENDES, J. S. Determinação de frações protéicas dos sorotipos Den-1 e Den-2 do vírus da dengue pelo teste "Western-Blotting". Uberlândia, MG, 2000. 75p. (Monografia).

MEZENCIO, J. M. S. Cinética de produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antigênico entre estirpes de *Rhizobium japonicum*. Viçosa, MG, UFV, 1981. 42p. (Tese M. S.)

MEZENCIO, J. M. S., SOUZA, W., FONSECA, M. E. F & Rebello, M. A. Replication of mayaro vírus in *Aedes albopictus* cells: na electron microscopic study. **Archives of Virology**, 104: 299-308, 1989.

MEZENCIO, J. M. S., SOUZA, W., FONSECA, M. E. F. & Rebello, M. A. Ultrastructural study of mayaro virus replication in BHK-21 cells. **Archives of Virology**, 114: 229-235, 1990.

MEZENCIO, J. M. S. & REBELLO, M. A. Mayaro virus proteins, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 88 (2): 299-304, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A Sociedade contra a Dengue**. Série B. Textos Básicos de Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, 24 p., 2002.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C. & STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3 ed. EUA: Academic Press, 1999. 629 p.

NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; GENARO, O. & LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9 ed. Belo Horizonte: Atheneu, 1998. 524 p.

NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., LAMPE, E. & SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue vírus type 2 in Isolation of dengue vírus type 2 in Rio de Janeiro, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 253, 1990.

NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., LAMPE, E. & SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., FILIPPIS, A. M. B., PEREIRA, M. A. S. & SCHATZMAYR, H. G. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

OLIVEIRA, N. M. M.; BROOM, A. K.; LINDSAY, M. D. A.; MACKENZIE, J. S.; KAY, B. H. & HALL, R. A. Specific enzyme immunoassay for the rapid detection of Ross River virus in cell cultures inoculated with infected mosquito homogenates. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 4, p. 195-205, 1994.

OLIVEIRA, J. R. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* em sementes de tomateiro. Viçosa, MG, UFV, 1995. 98p. (Tese D. S.)

PALFREYMAN, J. W., VIGROW, A., BUTTON, D. & GLANCY, H. Simple method for scanning immunoblots. **Journal of Immunological Methods**, v. 109, p. 199-201, 1988.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R., CANNON, L. T. & HOCKMEYER, W. T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 239-249, 1984.

PAPPAS, M. G.; LUNDE, M. N.; HAJKOWSKI, R. & McMAHON, J. Determination of IgM and IgG antibodies to toxoplasma using the IFA test, ELISA, and dot-ELISA procedures. **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 31-42, 1986.

PINHEIRO, F. P. & DA ROSA, A. P. A. Arboviroses. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 8ª edição, 1991.

RODRIGUE, L., MARION, D., TRUDEL, L., BARTHE, C. & LAVOIE, M. C. Comparison of methods for evaluation of oral microbiota of mice. **Journal of Microbiological Methods**, v. 10, p. 71-82, 1989.

ROEHRING, J. T. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of arthropod-borne togavirus antibodies. **Journal of General Virology**, v. 63, p. 237-240, 1982.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, p. 30-50, 1952.

SCHARTZMAYR, H. G., NOGUEIRA, R. M. R. & TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245-246, 1986.

SCHARTZMAYR, H. G. Viroses emergentes e reemergentes. **Caderno de Saúde Pública**, 17(suplemento): 209-213, 2001.

SERUFO, J. C.; OCA, H. M.; TAVARES, V. A.; SOUZA, A. M.; ROSA, R. V.; JAMAL, M. C.; LEMOS, J. R.; OLIVEIRA, M. A.; NOGUEIRA, R. M. R. & SCHATMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 503-504, 1993.

SHERWOOD, J. L.; SANBORN, M. R. & KEYSER, G. C. Production of monoclonal antibodies to peanut mottle virus and their use in enzyme-linked immunorbent assay and dot-immunobinding assay. **Phytopathology**, v. 77, n. 8, p. 1158-1161, 1987.

SHUAI, X. Z., LI-LI, J., XIAO-SU, Q. & YONG-HE, Z. Aplication of enzyme immunoassay on infected cells (EIA-IC) for arboviruses. **Acta Virology**, v. 30, p. 487-493, 1986.

SMITH, F. D. & BANTTARI, E. E. Dot-ELISA on nitrocellulose membranes for detection of potato leafroll virus. **Plant Disease**, v.71, n. 9, p.795-799, 1987.

TALARMIN, A.; LABEAU, B.; LALARGE, J. & SARTHOU, J. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1189-1192, 1998.

TRENT, D. W.; HARVEY, C. L., QURESHI, A. & LESTOURGEON, D. Solid-phase radioimmunoassay for antibodies to flavivirus structural and nonstrutural proteins. **Infection Immunology**, v. 13, p. 1325-1333, 1976.

TRENT, D. W. Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. **Journal Virology**, v. 22, p. 608-618, 1977.

WEI, H., JIANG, L., XUE, Y., FANG, D. & GUO, H. Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p.17-23, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory diagnosis. In: **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2 ed. Geneva, 1997. 84 p. Cap. 4, p. 34-47.

XU, J. Y., MIROSLAW, K. G. & ZOLLA-PAZNER, S. An immuno-dot blot assay for detection of antibody to HIV. **Journal of Immunological Methods**, v. 120, p. 179-183, 1989.