

Dyana Alves Henriques

Hemaglutinação passiva para detectar imunoglobulina
humana antidengue

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
2003

Dyana Alves Henriques

Hemaglutinação passiva para detectar imunoglobulina humana antidengue

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: 31 de março de 2003

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

Prof. Daison Olzany Silva

Prof. Jose Mario da Silveira Mezencio
(Orientador)

À MINHA AMADA MÃE, VALDECIR

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal de Viçosa.
- Ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.
- Ao Departamento de Biologia Geral, pela colaboração.
- Ao CNPq, pelo apoio financeiro.
- A todos os amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular, por todos esses anos de amizade, carinho e respeito.
- Aos Laboratórios: Controle de Hematozoários, Virologia Vegetal, Microbiologia Industrial, Fisiologia de Microrganismos, Virologia Animal, Virologia (UFU) e Imunoquímica II (UFRJ), por todo auxílio e paciência.
- Ao meu paizão e orientador, professor Mezencio.
- À minhas amigas de todas as horas, Jamária, Ellenizita e Adriana.
- À toda minha querida “família” viçosense.
- Aos meus grandes e insubstituíveis amigos, Marcos e Bruno.
- À minha irmã, Simone.
- À Marlene, pelo carinho.
- Ao Fábio, por tudo que tem me proporcionado desde que nos conhecemos.
- À todos meus professores.
- À todos meus amigos, pela importância em minha vida
- Ao Hércules.

BIOGRAFIA

Dyana Alves Henriques, filha de Eugênio Costa Henriques e Valdecir Alves Gonçalves, nasceu na cidade de São Paulo, SP em 03 de outubro de 1976.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em março de 1996, concluindo a graduação em Ciências Biológicas em outubro de 2000.

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

ÍNDICE

Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução	01
Revisão Bibliográfica	03
1. Arboviroses.....	03
1.1 Arbovírus.....	04
2. A dengue.....	05
2.1 Etiologia da doença.....	07
2.2 Agente vetor.....	09
2.3 Dengue clássica x febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue.....	10
3. Técnicas utilizadas para o diagnóstico da dengue.....	14
3.1 Testes sorológicos.....	14
3.2 Isolamento viral.....	17
3.3 Detecção molecular.....	18
Materiais e Métodos	19
1. Produção do anti-soro anti-hemácias humanas.....	19
1.1 Verificação da presença de IgG.....	20
1.2 Purificação das imunoglobulinas G.....	21
1.3 Obtenção de fragmentos Fab.....	23
2. Purificação do vírus dengue sorotipos 1 e 2.....	24
2.1 Infectividade e sorotipagem das partículas virais purificadas	26
3. Construção do conjugado vírus-Fab.....	27
Resultados	28
1. Produção do anti-soro anti-hemácias humanas.....	28
1.1 Verificação da presença de IgG.....	30
1.2 Obtenção de imunoglobulinas G puras.....	31
1.3 Obtenção de fragmentos Fab.....	36
2. Purificação do vírus dengue sorotipos 1 e 2.....	40
2.1 Infectividade e sorotipagem das partículas virais purificadas.....	41
3. Construção do conjugado vírus-Fab.....	42
Discussão	45
Conclusão	51
Referências Bibliográficas	52

RESUMO

HENRIQUES, Dyana Alves, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2003. **Hemaglutinação passiva para detectar imunoglobulina humana antidengue.** Orientador: Jose Mario da Silveira Mezencio. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Arnaldo Chaer Borges.

A dengue é uma doença febril, exantemática aguda considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem. O diagnóstico laboratorial da dengue é realizado após suspeita clínica e as técnicas imunoenzimáticas, principalmente ELISA, são as mais difundidas, detectando anticorpos das classes IgM e IgG. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica de hemaglutinação passiva de fácil execução, rápida e eficiente na detecção de anticorpos antidengue em sangue humano total. As próprias hemácias do paciente foram utilizadas como antígeno figurado, sendo o anti-soro contra hemácias humanas produzido em coelhos e purificado por precipitação e cromatografia. As imunoglobulinas G obtidas foram digeridas com o uso de papaína para a obtenção de fragmentos Fab. Após a separação, os fragmentos foram ligados às partículas virais de dengue, previamente purificadas em gradiente de densidade contínuo de tartarato de sódio e potássio, utilizando o glutaraldeído como agente acoplador. Demonstrou-se que a estratégia de conjugação dos fragmentos Fab à partícula viral é factível com uso de glutaraldeído, contudo, há necessidade do desenvolvimento de estudos para a verificação do grau de eficiência de conjugação. O método de conjugação adotado não impediu os fragmentos Fabs de se ligarem às

hemácias e nem os anticorpos antidengue de reconhecerem seus epítomos na partícula viral. A utilização de anticorpos monoclonais, ou sistemas de expressão para proteínas virais assim como para fragmentos de anticorpos facilitariam as etapas de montagem do conjugado, além de otimizar o funcionamento da técnica. Em conclusão, a detecção de anticorpos antidengue em amostras de soro e hemácias foi possível a partir do método proposto.

ABSTRACT

HENRIQUES, Dyana Alves, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2003. **Passive hemagglutination technique for ant dengue human immunoglobulin detection.** Adviser: Jose Mario da Silveira Mezencio. Committee members: Célia Alencar de Moraes and Arnaldo Chaer Borges.

Dengue is an acute febrile illness considered the most important arthropod-borne viral disease affecting humans. Currently most laboratory diagnoses of dengue are made after some clinical observations and use of immunoenzimatic techniques, notably ELISA can reliably detect small amounts of IgM and IgG classes of antibodies and have deserved worldwide acceptance. However, ELISA is a somewhat laborious, time-consuming technique and requires a expensive equipment. The present work was carried out to develop a feasible, inexpensive, quick and efficient passive hemagglutination technique for detection of anti-dengue antibodies in human whole blood, using the patient's blood cells as figured antigen. Antiserum against human erythrocytes was produced in rabbits and the IgG was purified by precipitation and chromatographic methods. IgG was then fractioned by papain digestion to yield Fab fragments. After separation, these fragments were linked by glutaraldehyde to the dengue viral particles successfully purified following a protocol which included centrifugation through a sodium and potassium tartarate density-gradient. However, the glutaraldehyde-mediated step need further work to establish an efficient degree of conjugation. The method did not alter either the Fab binding to erythrocytes or the recognition of viral epitopes by anti-dengue antibodies. Possibly, the use of monoclonal antibodies or a suitable system for

protein expression could improve the conjugation step and help to optimize the routine testing of samples. In conclusion, a simple technique has been demonstrated to be suitable for detection of anti-dengue antibodies in samples of human blood or erythrocytes plus serum.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril, exantemática aguda, considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem. O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. São vírus envelopados e com genoma RNA fita simples de polaridade positiva. Existem quatro sorotipos, den-1, den-2, den-3 e den-4, os quais não apresentam proteção cruzada entre si. As manifestações decorrentes da infecção por um dos quatro sorotipos virais podem variar de uma condição assintomática até um grau mais severo da doença, conhecido como febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue (DHF/DSS), passando pelo dengue clássico.

Em todo mundo são registrados anualmente cerca de 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 250 mil de dengue hemorrágico. A Organização Mundial de Saúde estima que 2,5 bilhões de pessoas no mundo possam vir a contrair a doença, sendo a maior parte dos susceptíveis habitantes de países em desenvolvimento, principalmente, os das regiões tropicais.

No Brasil, o *Aedes aegypti* é o principal transmissor da doença e pode ser encontrado em todo território brasileiro. A dispersão do vetor foi acompanhada pela disseminação dos diferentes sorotipos e, atualmente, circulam no país os vírus den-1, den-2 e den-3. Acredita-se que o desenvolvimento de DHF/DSS esteja relacionado a infecções heterólogas secundárias e a co-circulação de diferentes sorotipos aumentariam as chances de ocorrência da forma grave da doença. Entre os meses de janeiro e março

dos anos de 2001 e 2002 foram registrados 1.622 casos de febre hemorrágica com 66 óbitos, um aumento de mais de 1000% em relação ao ano de 1998, onde foram registrados apenas 105 casos.

O diagnóstico laboratorial da dengue é realizado após suspeita clínica e as técnicas imunoenzimáticas, principalmente ELISA, são as mais difundidas, detectando anticorpos das classes IgM e IgG. As técnicas de isolamento viral são menos utilizadas por serem técnicas mais trabalhosas e exigirem maior tempo. Além das técnicas sorológicas e de isolamento, existem as técnicas moleculares, utilizadas principalmente na pesquisa, pois apesar da alta sensibilidade e especificidade, uma série de fatores, entre eles econômicos, são empecilhos para seu uso no diagnóstico de rotina. O desenvolvimento de técnicas que facilitem o diagnóstico da dengue e permitam a sua realização em ambientes não laboratoriais, com baixo custo, é interessante visto que a dengue abrange uma parcela significativa da população habitante de regiões de difícil acesso e dependente do serviço gratuito de saúde.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica de hemaglutinação passiva, de fácil execução, rápida e eficiente na detecção de anticorpos antidengue em sangue humano total. A técnica baseia-se na síntese de um conjugado vírus dengue-Fab anti-hemácias humanas, que ao ser adicionado a uma amostra de sangue soropositiva para dengue seria capaz de aglutinar as hemácias pela formação de malha de precipitação entre os anticorpos antidengue e as partículas virais do conjugado. Em amostras negativas, a aglutinação não ocorreria pela ausência dos anticorpos antidengue para formação da malha.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ARBOVIROSES

Arboviroses são doenças causadas por vírus de um grupo ecologicamente bem definido, genericamente designado arbovírus (PINHEIRO & DA ROSA, 1991). As arboviroses apresentam uma distribuição geográfica que é ligada diretamente à distribuição do inseto vetor e de modo geral predominam nos trópicos onde os surtos dessas doenças tendem ser mais comuns nos períodos quentes e chuvosos do ano (BLAIR et al., 2000). Entretanto, em regiões de clima frio as arboviroses também se fazem presentes, a exemplo das encefalites japonesa, russa e eqüina (PINHEIRO & DA ROSA, 1991; BROOKS et al., 2000).

A ocorrência das arboviroses pode ser esporádica, epidêmica ou endêmica, adquirindo características regionais bem definidas. O quadro clínico apresentado pode variar desde formas benignas de natureza febril acompanhadas ou não de exantemas, até formas graves, caracterizadas por manifestações hemorrágicas ou alterações neurológicas (DIETZE, 1991, FIGUEIREDO & FONSECA, 2002).

A incidência de arboviroses anteriormente desconhecidas, emergentes e reemergentes, aumentou dramaticamente nas últimas duas décadas e algumas se tornaram sérios problemas para a saúde pública (BLAIR et al., 2000). Esse aumento é atribuído a vários fatores, entre os quais incluem-se o crescimento das populações humanas e as conseqüentes devastações de áreas virgens; a entrada do homem e de animais domésticos em novos

ecossistemas anteriormente ocupados pelos artrópodos, principalmente em florestas tropicais; os sistemas de irrigação precários, os quais não se preocupam com o controle dos artrópodos; o aumento descontrolado da urbanização, o que favorece a procriação dos vetores em ambientes artificiais onde a água se acumula, como canos, pneus, vasos, e em água de esgoto; a facilidade para o transporte de pessoas e de cargas vivas, inclusive entre continentes, possibilitando que vírus e artrópodos possam ser levados mais facilmente de um local a outro; as novas rotas de migração assumidas pelas aves; as mudanças climáticas; a falência dos programas de controle do vetor e de saúde pública (MURPHY, 1988). Em 1993 WALSH et al. afirmaram que “a maioria das viroses emergentes são zoonoses e o principal fator que determina a transferência desses vírus de animais hospedeiros para o homem são hábitos comportamentais”.

No Brasil, até 1985 foram isolados 134 arbovírus, dos quais 84 foram considerados como novos para o mundo (BARBOSA, 1996). A extensa área tropical do país e as florestas, como a Amazônica, junto com a diversidade de plantas e animais favorecem a ocorrência de zoonoses causadas por arbovírus. A maioria dos 165 milhões de habitantes do país vive em cidades médias e grandes das regiões sudeste e nordeste e, em muitos casos, a população vive em condições que favorecem a disseminação dos agentes vetores e etiológicos de diferentes doenças (FIGUEIREDO, 2000).

1.1 Arbovírus

O termo arbovírus, deriva da expressão “arthropod-borne viruses”, e significa vírus transmitidos por artrópodos (FORATTINI, 1965). A Organização Mundial de Saúde adota o conceito de que são “vírus que se perpetuam na natureza principalmente por propagação entre vertebrados hospedeiros suscetíveis e artrópodos hematófagos, ou pela transmissão transovariana ou venérea em artrópodos”. Este grupo inclui vírus de diferentes famílias, como Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae e Reoviridae, responsáveis por algumas das doenças consideradas mais severas ao homem e aos animais (MURPHY et al., 1999).

A perpetuação desse grupo na natureza se dá graças à capacidade de se replicarem tanto em células de artrópodos quanto em células de vertebrados

(CAUSEY & MAROJA, 1957; BROOKS et al., 2000). Os arbovírus se multiplicam em células de artrópodos hematófagos e são transmitidos na saliva para um vertebrado hospedeiro quando o vetor se alimenta. A replicação no animal hospedeiro provoca viremia em título e duração suficientes para permitir a infecção de outro artrópodo que venha a se alimentar do mesmo hospedeiro (BROOKS et al., 2000). O vírus no artrópodo replica-se principalmente nas glândulas salivares, causando uma infecção persistente e, a partir daí, pode ser transmitido também verticalmente. Num ciclo de infecção natural não ocorrem efeitos prejudiciais aparentes no artrópodo e nem no hospedeiro. Contudo, em dois dos ciclos nos quais o homem é o principal hospedeiro vertebrado ocorre o desenvolvimento de doença. São os ciclos da dengue e da febre amarela urbana (BLAIR et al., 2000).

O desenvolvimento de doença é mais comum quando o hospedeiro natural é substituído por um outro, nesse caso o homem ou outro animal doméstico. Como resultado, pode ocorrer um bloqueio na transmissão do vírus em casos onde o animal alternativo não seja o preferido da espécie de vetor hematófago, ou caso haja o desenvolvimento de viremia com baixos títulos e curta duração. Em outro ponto, a doença pode vir a se tornar um sério problema de saúde pública, com significantes taxas de morbidade e mortalidade, a exemplo das encefalites ou das febres hemorrágicas (BLAIR et al., 2000).

Já são mais de 500 arbovírus reconhecidos e distribuídos mundialmente, aproximadamente 100 causam doença ao homem, e cerca de 200 possivelmente são transmitidos por mosquitos (WALSH et al., 1993; BARBOSA, 1996). No Brasil são conhecidos 10 diferentes arbovírus pertencentes à família Flaviviridae, são eles, os vírus Bussuquara, Cacipacoré, Dengue tipos 1, 2, 3, Iguape, Ilhéus, Rocio, Encefalite de Saint Louis e Febre Amarela, cepa selvagem e cepa vacinal 17DD, todos possivelmente transmitidos por mosquitos (FIGUEIREDO, 2000).

2. A DENGUE

A dengue é considerada como a mais importante doença tropical causada por um arbovírus que afeta o homem, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999;

ANTUÑANO & MOTA, 2000, BROOKS et al., 2000). Nessas regiões são registrados anualmente 100 milhões de casos de dengue clássica e cerca de 500 mil de dengue hemorrágico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

O problema da dengue não é recente e a descrição de epidemias nos relatos clínicos e epidemiológicos registrados em uma enciclopédia chinesa do ano de 610 D.c, provavelmente são da doença. Nos três últimos séculos têm sido registrados casos de ocorrência de dengue em várias partes do mundo, com pandemias e epidemias isoladas atingindo as Américas, África, Ásia, Europa e Austrália (TEIXEIRA et al., 1999). Nos últimos vinte anos houve um aumento significativo na ocorrência da doença, tornando-se freqüente as epidemias de dengue clássico nos grandes centros urbanos das Américas e Caribe (GUBLER & TRENT, 1994). Além disso, registrou-se uma expansão geográfica da doença e a transmissão contínua de vários sorotipos, incluindo-se o fato preocupante da elevação no número de casos de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (DHF/DSS) (CHAMBERS et al., 1997). O número de casos de DHF passou de aproximadamente 295.591 casos anuais, na década de oitenta, para 514.139 na década de noventa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

A DHF pode causar altas taxas de mortalidade nos casos em que o tratamento médico adequado não é aplicado. A doença tornou-se a principal causa de morte entre crianças do Sudeste da Ásia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999), e as estimativas são de cerca de 3 milhões de óbitos nos últimos quarenta anos atribuídos à doença (TEIXEIRA et al., 1999).

No Brasil, a reintrodução do mosquito vetor ocorreu em 1967, após o declínio dos programas de controle do inseto. A primeira epidemia de dengue, com confirmação laboratorial aconteceu em 1982, no estado de Roraima. Entretanto a propagação viral para o resto do país ocorreu em 1986, a partir do estado do Rio de Janeiro (NEVES et al., 1998; FIGUEIREDO, 2000). Nos últimos anos as epidemias de dengue têm ocorrido em todas as regiões (Quadro 1) e tanto o vírus quanto o mosquito vetor encontram-se disseminados pelo país. Segundo dados do Ministério da Saúde, de 1986 a 2001 foram registrados 2,3 milhões de casos em 24 dos 26 estados juntamente com o Distrito Federal (NOGUEIRA et al., 2001).

Quadro 1: Casos de dengue clássica, febre hemorrágica da dengue e mortes confirmados entre janeiro e março dos anos de 2001 e 2002, por região geográfica do Brasil*. **Fonte:** Organização Panamericana de Saúde (PAHO), 2002

Região	Dengue		Variação (%)	Febre hemorrágica da dengue	Mortes
	Jan-Mar 2001	Jan-Mar 2002		Jan-Mar 2002	Jan-Mar 2002
Norte	30.829	9.847	-68.06	0	0
Nordeste	54.760	103.699	89.37	92	5
Sudeste	57.150	202.500	254.33	1.435	56
Sul	1.987	2.782	40.01	1	1
Centro-Oeste	10.717	38.787	261.92	1.717	70
Brasil	155.443	357.615	130.06	1.622	66
Brasil sem o estado do Rio de Janeiro	133,280	193,939	45.51	216	13

* Dados provisórios, sujeitos à mudança.

2.1 Etiologia da doença

A dengue é uma arbovirose febril exantemática aguda que não apresenta altos índices de mortalidade, embora seja grande o número de pessoas acometidas pela doença (HALSTEAD, 1992; PINHEIRO e CORBER, 1997). Sua relevância se faz pela disseminação mundial, ocorrendo em mais de 100 países e em uma população estimada de 1,5 milhão de pessoas, sendo que, potencialmente, mais da metade da população do globo corre o risco de contrair o vírus (MIAGOSTOVICH et al., 2001, GUBLER, 2002).

A doença é causada por um vírus envelopado pertencente à família *Flaviviridae* a qual inclui também os pestivírus e os hepacivírus. Eles se caracterizam por apresentarem uma única molécula de RNA fita simples, com polaridade positiva e o genoma compreende uma única ORF que codifica uma poliproteína, a qual é processada em outras proteínas virais. Esses vírus se replicam no citoplasma e o genoma é o próprio RNA mensageiro (FRANCKI et al., 1991; FIELDS et al., 1996; WEILAND et al., 1999; BROOKS et al, 2000).

As regiões funcionais e estruturais do genoma do vírus já foram definidas (MURPHY et al., 1999; FLINT et al., 2000). O vírion, com cerca de 65 nm de diâmetro apresenta três proteínas estruturais: a proteína C do capsídeo e as proteínas E e pré-M, que compõe o envelope (BARTH, 2000).

A proteína C é pequena (PM 12-14 kDa) e cópias múltiplas dessa proteína se associam ao RNA para compor o nucleocapsídeo icosaédrico. Já a proteína E é a maior proteína estrutural (PM 53-58kDa) e a mais abundante do envelope. Ela é a responsável pelas propriedades biológicas mais importantes do vírus, como a ligação aos receptores celulares, montagem do vírus, fusão celular, possui os epítomos que definem o sorotipo, entre outras características. A resposta imune contra a proteína E é a de mais longa duração (RICE et al., 1986; FIELDS et al., 1996).

A proteína pré-M (PM 20-24kDa) é assim chamada porque durante o brotamento ela é clivada e origina a proteína M (PM 7-9kDa). Também é formadora do envelope e somente após a sua clivagem o vírus torna-se completo e infectivo (FIELDS et al., 1996; ANTUÑANO & MOTA, 2000).

As sete proteínas funcionais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, são separadas a partir de 3 ou 4 clivagens realizadas por uma proteinase semelhante à tripsina, presente na porção N-terminal de NS3. As duas outras clivagens são feitas pela peptidase sinal celular. A proteína NS3 também funciona como helicase e protease, além de ser parte do complexo RNA polimerase. A proteína NS5 é uma RNA polimerase dependente de RNA (FRANCKI, et al., 1991; FIELDS et al., 1996; MURPHY, et al., 1999).

Especificamente, o vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, do latim “*flavus*” = amarelo e é tradicionalmente classificado em 4 sorotipos, den-1, den-2, den-3 e den-4, distinguíveis por suas características antigênicas (LEITMEYER et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2000; MIAGOSTOVICH et al., 2000).

O isolamento do vírus dengue foi originalmente realizado por Albert Sabin em 1945, quando identificou os sorotipos, den-1 e den-2. Os outros dois sorotipos, den-3 e den-4, somente foram isolados por Hammon em 1960, em pacientes com DHF/DSS (ROSEN & GUBLER, 1974; HALSTEAD, 1992).

Em 1982, durante a epidemia na cidade de Boa Vista, RO, foram isolados dois sorotipos, den-1 e den-4. Posteriormente, no ano de 1986, atribuiu-se ao sorotipo den-1 a responsabilidade pela epidemia e em 1990 o

sorotipo den-2 foi isolado pela primeira vez (FIGUEIREDO, 2000). Durante a epidemia no ano de 1990, quando os dois sorotipos estavam circulando no país, foram registrados os primeiros casos de DHF (TEIXEIRA et al., 1999).

Em janeiro de 2001, durante uma vigilância realizada na cidade de Nova Iguaçu, no Rio de Janeiro, um terceiro sorotipo, den-3, foi isolado do soro de uma paciente de 40 anos de idade (NOGUEIRA et al., 2001). A partir daí o vírus já foi isolado nos estados de Pernambuco, Ceará, São Paulo e Amazonas (SOUZA, et al., 2002; ARAÚJO, et al., 2002; TRAVASSOS, et al., 2002; CORDEIRO, 2002). A introdução de um novo sorotipo em território nacional é preocupante pelo fato de aumentar as chances da reinfecção por sorotipos heterólogos, resultando no desenvolvimento da DHF/DSS.

2.2 Agente Vetor

As primeiras evidências do ciclo de transmissão da dengue foram apresentadas por Bancroft em 1906, quando assumiu a hipótese do mosquito *Aedes aegypti* ser o agente vetor do vírus (ROSEN & GUBLER, 1974). Atualmente, sabe-se que outros mosquitos podem vir a ser potenciais transmissores do dengue, pois o mesmo 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).

Além da dengue, o *Aedes aegypti* é também o transmissor da febre amarela urbana. É originário da África sub-sahariana e foi importado para a América durante e após a escravidão. As fêmeas ovopositam na parede de qualquer recipiente, próximo ao nível da água (REITER et al., 1995; MICHIGAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION, 2002). É um mosquito essencialmente urbano, encontrado praticamente em todos os estados brasileiros. Na Américas é o único transmissor da dengue com importância epidemiológica. A disseminação do *Aedes aegypti* no território brasileiro foi feita por deposição de ovos pelo inseto em recipientes artificiais, principalmente pneus usados e pela disseminação de insetos adultos por ônibus, caminhões, trens, aviões e outros (NEVES et al., 1998).

Esse mosquito se adaptou ao ambiente criado pelo homem e tem nas cidades os criadouros preferenciais, a saber: latas, garrafas, pratos de vasos

de plantas, caixas d'água descobertas, piscinas, e outros. A fêmea exerce a hematofagia tanto fora quanto dentro das casas, geralmente no período entre 10-13 horas e após as 16 até às 19 horas, liberando uma substância anestésica no momento da picada, a qual evita o incômodo no indivíduo. Ao contrário do que se pensava, a fêmea tem a capacidade de fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, podendo assim infectar uma série de pessoas (DIETZE, 1991; REITER et al., 1995; MICHIGAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION, 2002).

O *Aedes albopictus* é uma espécie asiática trazida para o Brasil provavelmente nos anos de 1985 ou 1986, em navios para o transporte de minério de ferro, no Porto de Vitória, ES (NEVES, 1998). Atualmente esse inseto pode ser encontrado em ambiente silvestre, rural, periurbano e urbano, sendo o responsável pela transmissão da dengue e outras arboviroses na Ásia. No Brasil ainda não foi incriminado como vetor da dengue (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). É um mosquito de atividade diurna e visualmente difere do *Aedes aegypti* pela coloração, uma vez que o *Aedes albopictus* é negro e apresenta uma faixa branca-prateada longitudinal que vai da cabeça até o final do tórax (NEVES, 1998).

A transmissão vertical é uma característica importante dos arbovírus e as divergências sobre a transmissão transovariana do vírus dengue foram recentemente superadas com o uso da técnica de RT-PCR, onde os autores demonstraram a transmissão transovariana de vírus dengue tipo 2 em mosquitos *Aedes aegypti* coletados em Belo Horizonte (MG) (CECÍLIO, et al, 2000).

2.3 Dengue clássica x febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue

A infecção pelo vírus da dengue provoca um espectro de manifestações clínicas que varia desde uma infecção assintomática até uma forma mais severa, caracterizada por manifestações hemorrágicas e choque, a síndrome do choque da dengue (DSS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; 2001).

O quadro de sinais e sintomas manifestado por um paciente depende da cepa e sorotipo do vírus infectante; da idade; do estado imune do paciente e da constituição genética do indivíduo.

A dengue clássica é uma doença febril aguda com sintomas de um resfriado, manifestada principalmente por crianças e adultos. Apresenta baixa taxa de mortalidade e os sintomas variam de acordo com a idade. Geralmente, as crianças com idades entre 2 e 5 anos são assintomáticas ou apresentam febre indiferenciada e exantemas, enquanto crianças mais velhas ou adultos apresentam febre alta, dores de cabeça, dor retro-orbital, mialgias e artralgias ("febre quebra ossos"), náuseas, vômitos e exantemas. Manifestações hemorrágicas mais brandas como petéquias e púrpuras podem ocorrer nos casos de dengue clássico (RAMOS et al., 1993; FONSECA & FONSECA, 2002).

A DHF é caracterizada por febre alta com duração de 2-7 dias, seguida por fenômenos hemorrágicos mais intensos, inclusive o extravasamento plasmático que é a principal anormalidade fisiopatológica observada; contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ e algumas vezes falência do sistema circulatório. Os pacientes que manifestam complicações sérias de circulação progridem para o choque hipovolêmico. Os principais sinais manifestados são, pulsação rápida e fraca, menor ou igual a 20 mm Hg; hipotensão, frio e inquietação. Esse quadro é conhecido como DSS e requer a intervenção médica adequada, uma vez que as taxas de mortalidade podem exceder a 20% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; 2001).

Para qualquer uma das formas da dengue, seja a dengue clássica, DHF ou DSS, são reconhecidas as fases aguda e a de convalescença. Após a picada do mosquito o vírus permanece incubado por um período de 2-3 dias e, posteriormente, inicia-se a fase aguda da doença quando os sinais e sintomas começam a se manifestar. Essa fase é caracterizada pela febre, a qual dura de 2-7 dias, e nesse período ocorre o pico de viremia (FONSECA & FONSECA, 2002).

A fase crítica é a intermediária, quando o indivíduo não apresenta a febre. Ela dura de 2 a 3 dias após a fase aguda, e não resulta em maiores complicações, exceto em casos de evolução para DHF/DSS. Ela é denominada de crítica por ser a fase onde costumam ocorrer as complicações hemorrágicas e a progressão ao choque (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

A fase de convalescença é o período posterior ao desaparecimento dos sintomas e pode se prolongar por semanas, estando associada com prostração e depressão, especialmente em adultos (DE PAULA et al., 2002a).

Os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento da DHF/DSS ainda não foram completamente elucidados. A doença foi reconhecida em 1950 no sudeste da Ásia (ROTHMAN & ENNIS, 1999).

As hipóteses desenvolvidas para explicar a ocorrência das formas hemorrágicas do dengue incluem a de que há uma forte associação entre infecções heterólogas secundárias e a forma severa da doença (RAMOS et al., 1993), isso porque a DHF/DSS ocorre em indivíduos que já foram infectados com um sorotipo e reinfectados por um segundo sorotipo.

A hipótese denominada “teoria imunológica de Halstead” que se refere ao fenômeno denominado “aumento da infecção mediada pelo sistema imune” (immune enhancement of infection) é uma das mais contempladas (HALSTEAD, 1992; RAMOS et al., 1993; ROTHMAN & ENNIS, 1999). Nesse caso, os anticorpos adquiridos em infecções prévias para um determinado sorotipo não seriam neutralizantes ou seriam produzidos em títulos muito baixos, incapazes de neutralizar o sorotipo responsável pela reinfeção. A opsonização do vírus facilita a fagocitose pelos fagócitos mononucleados, estes as células-alvo para a replicação viral. A fagocitose das partículas virais não neutralizadas favorece a ação viral e, dessa forma, há um aumento da carga viral, intensificação da resposta imune e conseqüente liberação de aminas vasoativas, que provocam aumento na permeabilidade vascular (HALSTEAD, 1988; ROTHMAN & ENNIS, 1999). Estudos recentes sugerem que citocinas e mediadores químicos (Fator de Necrose Tumoral, Interleucinas 1, 2 e 6, Interferon δ , Fator Ativador de Plaquetas, C_{3a} , C_{5a} e histamina) seriam os potencializadores dos sintomas da DHF/DSS, uma vez que os monócitos/ macrófagos infectados ativam linfócitos TCD₄, promovendo a maior liberação de interferon δ e outras citocinas. O interferon δ ativa a expressão de receptores Fc- δ , com a conseqüente fagocitose de outros complexos vírus-imunoglobulinas e a criação de um “círculo” potencializador da infecção e agravamento da doença. Dessa forma, há um aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e disfunção do sistema de coagulação, o que leva a hemorragias (ROTHMAN & ENNIS, 1999).

Um estudo feito na Tailândia mostrou que crianças com menos de um ano de vida e que contraíram dengue pela primeira vez desenvolveram DHF/DSS porque haviam adquirido anticorpos contra o vírus por imunidade passiva. Os anticorpos recebidos em altas concentrações durante o

nascimento protegem as crianças da infecção pelo vírus, mas com o tempo o título de anticorpos protetores decresce e permanecem na circulação apenas os anticorpos reforçadores da infecção (IEA=Infection-Enhancing Antibodies), ou seja, anticorpos de risco para o desenvolvimento de DHF/DSS (KLIKIS et al., 1988).

O desenvolvimento de DHF/DSS foi relacionado a uma maior virulência de determinadas cepas do vírus (ROSEN, 1977). O estudo das características clínicas e sorológicas de casos de dengue no Peru mostrou que o vírus den-2, genótipo americano, provavelmente não possuía as propriedades necessárias para causar as formas severas da doença (WATTS et al., 1999), o que reforçaria a hipótese de Rosen. Dados do “Center for Disease Control and Prevention”, Atlanta, EUA, indicam que o sorotipo do vírus seria um fator de risco para o desenvolvimento de DHF. Infecções primárias pelo vírus den-2, seguidas por infecções secundárias de qualquer outro sorotipo, aumentam as chances do desenvolvimento de DHF (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2000).

Em uma terceira hipótese, KOURI et al. (1987) propõem o desenvolvimento de DHF/DSS como de maneira multicausal, considerando a interação de fatores relacionados ao agente etiológico, ao hospedeiro e ao vetor. Os autores reconhecem que as outras hipóteses por si só não consideram os eventos epidemiológicos que ocorrem no mundo e reconhecem vários fatores como sendo de risco. Fatores relacionados ao hospedeiro seriam idade, sexo, raça, estado nutricional, pré-existência de enfermidades crônicas, presença de anticorpos e intensidade da resposta imunológica a infecções anteriores; relacionados ao vírus seriam a hiperendemicidade, virulência da cepa circulante e sorotipos virais envolvidos em cada evento epidemiológico; entre os fatores relacionados ao agente vetor, estariam a competência e densidade vetorial e, finalmente, entre os fatores epidemiológicos estariam a imunidade de grupo, intervalo de tempo entre as infecções por diferentes sorotipos e a intensidade da circulação viral.

TEIXEIRA et al. (1999) assume que a hipótese multicausal para o desenvolvimento de DHF/DSS é uma tentativa de explicação mais totalizadora, ao reconhecer que o resultado das apresentações epidemiológicas e clínicas do indivíduo nas populações depende de todos os elos e fatores interligados,

aproximando e considerando a complexidade dos fenômenos envolvidos na determinação destas infecções.

3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA DENGUE

O método de detecção do vírus dengue utilizado por Albert Sabin, ou seja, o isolamento viral após sucessivas passagens em ratos, permitiu a identificação de dois dos quatro sorotipos do vírus (ROSEN & GUBLER, 1974). Atualmente, os testes utilizados para a detecção do vírus da dengue podem ser reunidos em três categorias: os sorológicos; os de isolamento viral e os de detecção molecular (DE PAULA et al., 2002a, MIAGOSTOVICH et al., 2001).

O diagnóstico correto da doença requer a realização de uma série de etapas e não se detém apenas na detecção do vírus. Primeiramente, o histórico do paciente precisa ser examinado, assim como sua região de moradia, relacionando-o à epidemiologia da doença. Os sinais e sintomas apresentados pelo paciente, associados à infecção viral, também devem ser considerados. O conjunto de todos esses itens, somados à confirmação laboratorial garante um diagnóstico preciso (PRIBIL et al., 2001).

3.1 Testes sorológicos

Nas análises sorológicas, as interações específicas dos antígenos virais com os anticorpos são usadas para detectar os vírus e a resposta imune contra eles (FLINT et al., 2000). Atualmente, os testes sorológicos ainda são os mais utilizados no diagnóstico de rotina da dengue, dada à facilidade e simplicidade dos procedimentos. Basicamente, quatro testes sorológicos são os mais comumente utilizados: Inibição de hemaglutinação (HI); Fixação do complemento (CF); Teste de Neutralização (NT) e o MAC-ELISA (LENNETE, 1992; HECHAVARRIA, 2002).

Os testes NT, HI e FC são também utilizados para agrupar os vírus de acordo com as suas relações antigênicas, e por isso muito úteis para a taxonomia. Já a classificação em gêneros, sorogrupos, complexos, tipos, subtipos e variedades são confirmados por análises morfogénicas e moleculares (CALISHER, 1980; LENETTE, 1992).

O teste de inibição da hemaglutinação foi, por muitos anos, o mais utilizado para a detecção da dengue (MIAGOSTOVICH, 2001). É um teste sensível e de fácil execução, necessitando de equipamentos básicos utilizados rotineiramente no laboratório. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação podem permanecer detectáveis por mais de 48 anos, sendo bastante útil para estudos soropidemiológicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A HI é uma técnica rápida, realizada em aproximadamente 30 minutos, que pode ser utilizada para a verificação da quantidade relativa de vírus em uma amostra. Contudo, ela é pouco específica e tem baixa sensibilidade quando utilizada em amostras com títulos baixos (FLINT et al., 2000).

O FC não é utilizado com frequência para o diagnóstico de rotina, por ser de mais difícil execução e requerer pessoal qualificado e treinado. Os anticorpos detectados por FC aparecem mais tardiamente do que os detectáveis por HI e persistem por pequenos períodos. A utilização do teste de FC está mais relacionada a infecções primárias, para as quais é específico porque a resposta em infecções primárias é monotípica, enquanto nas infecções secundárias é amplamente heterotípica (GUBLER & SATHE, 1988).

O NT é o mais específico dos testes e, por isso, muito importante para a classificação. Como no teste de FC, a especificidade somente é válida para as infecções primárias. O custo do teste é elevado e o tempo necessário para a sua realização é considerado como muito dilatado, além das dificuldades inerentes à técnica (GUBLER & SATHE, 1988).

A ocorrência de reações cruzadas com outros flavivírus, ou vírus que causam infecções clínicas semelhantes, mesmo não sendo da mesma família constituem um dos principais problemas para o uso destes testes. Além disso, requerem altos títulos de anticorpos específicos para se fazer o diagnóstico da doença. No caso do dengue os anticorpos começam a ser detectados, em média, após o quinto dia do contágio o que dificulta o diagnóstico rápido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; VORDAM & KUNO, 1997).

Atualmente, para o diagnóstico de rotina, os testes imunoenzimáticos têm sido os mais utilizados em razão da alta sensibilidade, facilidade de execução e rapidez. Dentre esses, o mais utilizado é o ELISA, o qual permite a detecção de anticorpos das fases aguda (IgM), de convalescença (IgG), bem como a detecção do antígeno (TIZARD, 1998). Na variante do ELISA, denominada MAC-ELISA, os anticorpos IgM são capturados no soro de

pacientes pela ligação destes ao antígeno complexado e fixado à placa de poliestireno. O MAC-ELISA tem sido uma valiosa ferramenta na vigilância da dengue e DHF/DSS e sua principal vantagem é a de permitir a análise de um grande número de amostras laboratoriais com relativa facilidade. O MAC-ELISA detecta anticorpos IgM, requerendo, portanto, apenas uma amostra do soro, dispensando amostra pareada do período de convalescença para a confirmação da doença, além de permitir o diagnóstico ainda na fase aguda (VORDAM & KUNO, 1997).

Testes para detecção de IgG antidengue, ou Ig total no soro, plasma ou sangue heparinizado diferenciam as infecções primárias das infecções secundárias. Eles são simples, de fácil manipulação e apresentam sensibilidade comparável ao teste de HI (MEDIVAX, 2000), porém a especificidade é baixa e permite a ocorrência de reações cruzadas com outros flavivírus, além de não diferenciar os sorotipos (GUBLER, 1989).

Diferentes tipos de ELISA têm sido descritos para o diagnóstico de dengue e outros arbovírus. ZE-SHUAI et al. (1986) e OLIVEIRA et al. (1995), padronizaram técnicas imunoenzimáticas (EIA) com anticorpos monoclonais para detecção de arbovírus em culturas de células infectadas. TALARMIN et al. (1998) desenvolveram um ELISA para captura de IgA específica para o vírus do dengue e compararam essa técnica de captura de IgA com o MAC-ELISA. Eles concluíram que a primeira mostrou-se mais sensível e específica quando os espécimes analisados foram coletados entre 6 e 25 dias após o início dos sintomas, período que inclui o pico de IgA. Amostras coletadas nos primeiros dias da infecção tiveram especificidade e sensibilidade reduzidas. Segundo os autores, a técnica é simples e poderia ser realizada em conjunto com o MAC-ELISA, para auxiliar a interpretação de resultados sorológicos.

O uso de anticorpos monoclonais para a detecção de antígenos tem melhorado a especificidade do ELISA por diminuir a ocorrência de reações cruzadas. BROOM et al. (1998) desenvolveram um painel de anticorpos monoclonais específicos para identificar alfa e flavivírus isolados de mosquitos. A técnica mostrou-se sensível, rápida e mais específica do que os métodos tradicionais usados para a identificação de flavivírus.

O diagnóstico da dengue tem sido feito com o uso de métodos que incluem: radioimunoensaio utilizando anticorpos monoclonais para a detecção do vírus (MONATH et al., 1986), técnicas de hemoadsorção para a detecção de

IgM antidengue (GUNASEGARAN et al., 1986) e hemólise em gel (THONGCHAROEN et al., 1993). A técnica de “imunodot blot” pode ser utilizada para a diferenciação entre dengue e febre Mayaro, duas doenças clinicamente semelhantes (HENRIQUES & MEZENCIO, 2000).

3.2 Isolamento viral

O isolamento do vírus da dengue pode ser realizado com o uso de quatro técnicas. A primeira, utilizada por Sabin, consiste na inoculação do vírus em cérebro de camundongos neonatos (ROSEN & GUBLER, 1974). Ela é específica, porém de baixa sensibilidade e requer a manutenção de um biotério, o que eleva os custos e requer tempo dilatado para o isolamento.

A segunda técnica utiliza mosquitos para o isolamento (ROSEN e GUBLER, 1974). O vírus é inoculado parenteralmente em mosquitos do gênero *Aedes* sp e *Toxorhynchites* sp. É uma técnica mais sensível do que a técnica de formação de placas em células LLC-MK₂, tendo sido utilizada na Indonésia por GUBLER et al. (1979) em estudos de vigilância virológica da febre hemorrágica do dengue. A técnica, embora mais sensível requer um insetário e é trabalhosa.

O isolamento do vírus da dengue pode também ser feito em culturas de células de mamíferos (BARTH, 2000). Esse não é um método usualmente utilizado por apresentar baixa sensibilidade. Além disso, dependendo do tipo de cultura celular, os custos podem ser altos e o isolamento demorado (LENNETE, 1992).

Em estudos com arbovírus, principalmente com o vírus da dengue, as linhagens celulares de mosquitos são bastante utilizadas. Elas apresentam maior sensibilidade a esse vírus que as de vertebrado e são de fácil crescimento e manutenção. O isolamento do vírus em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus* data de 1960 e, desde então, várias linhagens celulares de diferentes mosquitos têm sido utilizadas (BARBOSA, 1998).

O isolamento em células de mosquitos associada à detecção dos antígenos no cultivo celular por imunofluorescência, é um método sensível e de custos relativamente baixos, porém apresenta menor sensibilidade do que a inoculação parenteral em mosquitos (LENNETE, 1992).

3.3 Detecção molecular

O diagnóstico da dengue pode ser feito com o uso de métodos que detectem seqüências do ácido nucléico viral em amostras de tecidos ou células infectadas (FLINT et al., 2000). São técnicas sensíveis e específicas, contudo no Brasil, a maioria dos laboratórios ainda utiliza os testes sorológicos para o diagnóstico. As técnicas moleculares mais trabalhadas têm como base o PCR, porém para o diagnóstico de DHF é usual a utilização de sondas biotiniladas ou marcadas com ^{32}P , pois o isolamento do vírus nesse caso pode ser dificultado, uma vez que o mesmo se encontra complexado a anticorpos, diminuindo assim a sua infectividade (RAMOS et al., 1993).

A detecção com sondas biotiniladas é menos sensível do que a com sondas radiomarcadas, porém a primeira técnica é mais utilizada para identificação viral direta em amostras clínicas (HENCHAL et al., 1987). As técnicas de hibridização dos ácidos nucléicos também têm sido muito utilizadas em estudos epidemiológicos (TEIXEIRA et al., 1999).

O RT-PCR tem sido o mais utilizado para o vírus dengue. Variante, como o RSS-PCR (Restriction site-specific-PCR), foi descrita para a subtipagem dos vírus do dengue por HARRIS et al. (1999) e MIAGOSTOVICH et al. (2000). A técnica consiste de um RT-PCR usando “primers” específicos para o gene da proteína E do envelope e uma endonuclease de restrição polimórfica. Os produtos da RT-PCR gerados migram de formas diferentes, formando bandas distintas para as diferentes cepas. A técnica é simples, rápida e requer o mínimo de equipamento laboratorial (MIAGOSTOVICH et al., 2000).

LIOTTA et al. (2000) estabeleceram a técnica de RT-PCR para detecção dos vírus den-1 e den-2 em *pools* de mosquitos. Ela se mostrou útil para estudos epidemiológicos e de vigilância do vetor. DE PAULA et al. (2001) demonstrou que a melhor amostra coletada de pacientes para a detecção do vírus dengue por RT-PCR é a de soro, ao invés de sangue ou “buffy-coat”, uma vez que foi possível detectar o agente mesmo na sua ausência de replicação.

Entretanto, devido aos custos e necessidade de pessoal qualificado, as técnicas moleculares permanecem restritas aos trabalhos de pesquisa, sendo o diagnóstico de rotina feito por métodos sorológicos como o MAC-ELISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. PRODUÇÃO DO ANTI-SORO ANTI-HEMÁCIAS HUMANAS

Preparo do antígeno (hemácias): Cerca de 5 ml de sangue completo foram coletados em um único ponto de doadores humanos sadios e em jejum de doze horas, utilizando-se seringas descartáveis. As amostras foram transferidas para tubos contendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Anotou-se o grupo sanguíneo dos doadores classificados pelo sistema ABO.

Processamento do antígeno: Após a coleta da amostra de sangue foi adicionado ao tubo um volume equivalente de solução salina 0,85% p/v. Em seguida, o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B a 7800 *g*, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Volume de solução salina duas vezes maior que o inicial de sangue foi adicionado e a amostra foi novamente centrifugada. Repetiram-se mais três lavagens das hemácias em salina e após a última lavagem, o sedimento de hemácias foi ressuspense no volume equivalente de solução salina para se obter uma suspensão de hemácias a 50%. Essa suspensão foi colocada em tubos do “tipo penicilina” e mantida sob refrigeração a 4°C, por um período máximo de uma semana.

Preparo do anti-soro: Hemácias lavadas e emulsificadas com o adjuvante de Freund completo (volume por volume) foram injetadas em dois grupos de dois coelhos machos da raça Nova Zelândia com idade de 2 a 3

meses em intervalos de 15 dias, durante 1 mês e meio, por injeção intramuscular em três pontos. O segundo grupo de 3 coelhos recebeu injeções intravenosas de suspensões de hemácias a 10%, em salina, em intervalos distintos, durante 15 dias (GARVEY *et al.*, 1977). Após os períodos determinados nos protocolos, foi coletado o sangue dos animais e obtido o soro. O soro para se constituir o controle das reações foi obtido de 20 mL do sangue dos animais retirados antes da inoculação das hemácias.

Preparo do anti-soro: O sangue coletado foi deixado em repouso, no ambiente e, em seguida, sob refrigeração, por um período de 12 horas, para a separação do soro. A seguir, ele foi recolhido e centrifugado, em centrífuga refrigerada a 1900 *g* por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante aliqotado e congelado à -20°C.

1.1 Verificação da presença de IgG

Hemaglutinação: A hemaglutinação foi feita em placas de microtitulação de 96 orifícios, em cada um dos quais foram adicionados 25 µL de solução salina a 0,85% p/v. Em seguida, foram adicionados 25 µL do anti-soro e efetuaram-se diluições seriadas com de fator de diluição igual a 2. Nos orifícios contendo o anti-soro diluído foram adicionados 25 µL da suspensão de hemácias a 2% e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para constatação do IgM no soro foram adicionados 25 µL de β-mercaptoetanol 0,2 M em salina 0,85% p/v, anteriormente à adição das hemácias. O tratamento do anti-soro com o agente redutor foi feito por 30 minutos em estufa a 37°C, para posterior realização do teste de hemaglutinação.

Imunodifusão radial dupla: A técnica de imunodifusão radial dupla foi realizada em lâminas de vidro previamente preparadas. Elas foram inicialmente imersas em agar nobre 0,1% em solução salina 0,85% p/v. A seguir, foi adicionada à superfície da lâmina uma camada de agar 0,9% em tampão salina-borato pH 8,4-8,5. Após a formação do gel o agar foi perfurado para formação dos poços de reação e cerca de 10 µL do antígeno foram adicionados ao orifício central. Aos poços em torno do central foram adicionados 10 µL de diluições do anti-soro em solução salina 0,85%. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, seis horas antes da leitura da reação.

1.2 Purificação das imunoglobulinas G

Purificação de IgG por precipitação usando ácido caprílico e sulfato de amônia: O primeiro método para obtenção de IgG de coelho foi o descrito por HARLOW e LANE (1988), cujo protocolo associa dois métodos de precipitação de IgG, a precipitação com o ácido caprílico e a precipitação com o sulfato de amônia. Cerca de 30 mL do soro sanguíneo foram diluídos em 120 mL de tampão acetato 60 mM, pH 4,0. Após a adição do tampão, o pH da mistura foi ajustado para 4,5 com hidróxido de sódio 0,1N. Em seguida foram adicionados 25µL de ácido caprílico para cada mililitro e o material foi mantido à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. A mistura foi centrifugada a 7800 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado e o volume medido adicionado de uma quantidade de PBS [10x] 10 vezes menor, o pH ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. Ele foi colocado sob refrigeração a 4°C para adição de sulfato de amônio até alcançar 45% de saturação. A mistura permaneceu refrigerada sob agitação por 30 minutos e foi novamente centrifugada a 2400 *g*, por 40 minutos. O sedimento foi ressuspenso em um volume de PBS [10x] 10 vezes menor que o volume inicial de soro. Em seguida, o material foi dialisado contra PBS em membrana de diálise de celulose, poro de 12kDa, por 48 horas. Após a diálise, o material foi aquecido a 50-55°C por 20 minutos seguindo-se uma nova centrifugação em centrífuga Eppendorf®, a 2400 *g* por 20 minutos. Para melhorar a purificação da amostra de IgG foram feitas mais duas precipitações com sulfato de amônia a 33% p/v.

Purificação de IgG por cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A-sepharose (IL-CL4B): O protocolo adotado segue o descrito por GARVEY et al. (1977). A montagem da coluna foi feita em uma seringa de 5mL com o fundo da seringa recoberto com lã de vidro e nylon (80 mesh). O gel de 1 g de proteína A foi intumescido com PBS e aplicado na coluna. A seguir a coluna foi lavada com PBS para a retirada de conservantes e azida sódica. Foram feitas várias lavagens e as frações recolhidas foram monitoradas em espectrofotômetro a 278 nm, até a leitura aproximar-se de zero. A coluna foi compactada à temperatura ambiente. A seguir, foram aplicados cerca de 3 mL de soro e 1,5 mL de PBS e a coluna foi mantida a 4°C, por 12 horas, para toda a IgG ligar-se à matriz. A coluna foi lavada pela adição de um volume de PBS suficiente para deslocar as frações retidas e amostras sucessivas de 1,5 mL foram coletadas. As leituras de absorbância das frações

colhidas foram efetivadas em espectrofotômetro a 278 nm. Em seguida, a coluna recebeu tampão glicina-HCL 0,2 M pH 2, 3, observando-se a mudança do pH básico para ácido. A partir dessa fase as frações de 1,5 mL foram coletadas e monitoradas em espectrofotômetro a 278 nm. As frações contendo IgG foram neutralizadas com tampão tris 0,2 M pH 10, 7, sendo adicionados 0,4 mL de Tris em cada 1,5 mL de glicina. As frações de maior absorbância foram concentradas em concentrador Amicon®.

Purificação de IgG por cromatografia de troca iônica utilizando coluna de dietilaminoetil (DEAE) sepharose (DE52 Whatman-IL2): A purificação de IgG por cromatografia de troca iônica foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por GARVEY et al. (1977). A DEAE Sepharose (DE52 Whatman-IL2) foi empacotada em uma seringa de 5mL e inicialmente lavada com água, cerca de 500 mL. A seguir, um volume aproximado de 50 mL de NaOH 0,5 N foi passado pela coluna para a retirada de íons, seguindo-se novas lavagens com tampão fosfato pH 6,4 até equilibrar o pH da coluna. Inicialmente, 3 mL do soro utilizado foram dialisados contra tampão fosfato 0,2 M pH 6,4 por 12 horas. Em seguida, foram passados pela coluna e frações de aproximadamente 1,5 mL foram eluídas com tampão fosfato 0,2 M pH 6,4 e recolhidas para constatar a presença de IgG em espectrofotômetro, a 278 nm. Obtidas as frações de IgG, NaCl 1 M foi adicionada para eluir as outras proteínas do soro.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE): O grau de pureza das imunoglobulinas G foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, utilizando-se do método descrito por LAEMMLI (1970). A coloração das proteínas foi realizada com o azul de Coomassie ou nitrato de prata. O gel de separação foi preparado utilizando-se de tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS (sulfato duodecil de sódio) a 10%; APS (persulfato de amônio) a 10%; TEMED (N,N,N,N –tetra etileno diamino) e solução de acrilamida: bisacrilamida 30%. Para o gel de empilhamento utilizou-se tris-HCl 1,0 M pH 6,8; SDS a 10%; APS a 10%; TEMED e solução de acrilamida: bisacrilamida a 30%. O gel de separação foi vertido na cavidade da placa previamente montada e acrescido de uma fina camada de n-butanol, posteriormente retirada com água destilada. Após a polimerização do gel de separação, foi adicionado o gel de empilhamento e o pente para a formação dos poços de aplicação das amostras. As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo o

tampão tris-glicina 0,025 M pH 8,3. As amostras protéicas foram diluídas, volume a volume, em tampão de amostra com β -mercaptoetanol e submetidas a um aquecimento de 100°C por cinco minutos. Estas amostras foram aplicadas nos poços do gel e a migração eletroforética transcorreu a 50 V.

Dosagem protéica: A dosagem de proteína presente nas amostras purificadas foi feita pelo método de LOWRY et al. (1951) e por determinação da absorbância em espectrofotômetro (PETERSON, 1983). Para a dosagem por Lowry, as amostras foram diluídas 1:10, 1:20 e 1:40, num volume final por tubo de 500 μ L. Os controles positivos consistiram de albumina sérica bovina, em concentrações já conhecidas, e o controle negativo, de água. A cada tubo foram adicionados 5 mL da solução A (LOWRY et al, 1951) seguindo-se a agitação em temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, 500 μ L do reagente B (LOWRY et al., 1951) foram adicionados e as amostras foram novamente agitadas e repousadas por 10 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 660nm. Segundo PETERSON (1983), o coeficiente de extinção específica de uma amostra contendo 10 mg de IgG/mL em uma cubeta de 10 mm de largura medido em espectrofotômetro a 278 nm, é igual a 13,8. Assim a concentração aproximada de IgG foi calculada a partir do resultado da leitura da absorbância em 278 nm.

1.3 Obtenção de fragmentos Fab

Clivagem de moléculas de IgG com papaína: A digestão das moléculas de IgG foi feita segundo GARVEY et al. (1977). A concentração protéica da amostra constituída por um “pool” das frações que continham a IgG após a sua purificação foi determinada por espectrofotometria, a 278nm. A fração contendo IgG foi dialisada contra tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 por uma noite. Após a diálise foi realizada uma nova quantificação em espectrofotômetro à 278nm. Em seguida, a seguinte mistura de reação foi preparada, sendo constituída para cada 100mg de proteína de: 5 mL de solução de proteína a 2% - (20mg/mL); 0,75 mL de EDTA sódico 0,02 M; 0,75 mL de cisteína 0,01 M e 1 mg de papaína. O tubo com a mistura foi transferido para banho-maria a 37°C onde permaneceu entre 3 e 9 horas. A reação de clivagem da papaína foi interrompida com ácido p-cloromercuribenzoato, concentração final de 0,001 M. Em seguida, a mistura foi dialisada contra tampão PBS para a retirada completa do ácido p-cloromercuribenzoato.

Separação dos fragmentos Fab: A separação dos fragmentos Fab foi feita em duas etapas. Primeiramente, a amostra digerida foi eluída em coluna de cromatografia de afinidade, usando-se a resina de proteína A sepharose para a retirada dos fragmentos Fc. Em seguida, foi lavada e concentrada em concentrador Amicon®, utilizando-se de membrana de 30 µm, o que permitiu a passagem da papaína (PM 21 kDa) e a retenção dos fragmentos Fab (PM 50 kDa). Os fragmentos Fab foram, posteriormente, concentrados em tampão PBS. As moléculas contaminantes de IgG foram separadas dos fragmentos Fab, após nova lavagem com PBS em concentrador Amicon®, utilizando-se membrana de 100 µm, o que retirou os fragmentos Fab e reteve a IgG (PM 150-160 kDa). A sua presença nas frações que continham os fragmentos Fab foi comprovada por espectrofotometria e por hemaglutinação, para posterior concentração.

2. PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2

Cultura de células: O clone de células de mosquitos utilizado no trabalho foi o C6/36 *Aedes albopictus*, gentilmente cedido pelo Professor Moacyr Alcoforado Rebello do IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio D-MEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”) suplementado com 0,25% de bicarbonato de sódio, 500 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino e acondicionado em garrafas de plástico (25 cm²) mantidas a 28°C. Após a confluência das células na cultura foi efetuada a lavagem em PBS e, a seguir, as células foram repicadas utilizando-se solução de PBS-tripsina a 0,25%, com posterior ressuspensão das células em meio de cultura e passagem para três outras novas garrafas do mesmo tamanho. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C e utilizadas após a confluência das células em uma monocamada. As culturas utilizadas de células VERO foram mantidas em garrafas de vidro (33cm²) ou de plástico (25 cm²), a 37°C em meio MEM (“Modified Eagle Medium”) 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.

Vírus: As amostras de vírus dengue, sorotipos den-1 e den-2, coletadas do sobrenadante de células *Aedes. albopictus* infectadas foram gentilmente doadas pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, sendo mantidas em vidros de penicilina e acondicionadas em ultracongelador a -80°C.

Multiplicação do vírus dengue: As culturas de células de mosquito C6/36 *A. albopictus* no estágio de recém-confluentes, em meio líquido, foram selecionadas para a infecção em separado com os dois sorotipos do vírus. Removido o meio, foi adicionado as células o meio líquido D-MEM, desprovido de soro fetal, em quantidade suficiente para cobrir a monocamada. A seguir, foram adicionados cerca de 100 µL de cada sorotipo por frasco. As culturas permaneceram em estufa a 28°C, por 90 minutos, sob agitação em intervalos de 5 minutos. Após esse período foi efetuado o descarte do meio com o vírus, um novo volume de meio D-MEM completo foi adicionado e as culturas novamente colocadas em estufa a 28°C. Após a observação do efeito citopático o sobrenadante foi centrifugado em rotor SS-34, centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B a 7800 g, a 4°C por 10 min. Em seguida, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram dispensadas em vidros de penicilina e mantidos em ultracongelador a -80°C. O procedimento para a multiplicação do vírus em culturas de células VERO já foi descrito, utilizando meio MEM e temperatura de incubação de 37°C.

Titulação dos vírus den-1 e den-2: A titulação dos dois sorotipos do vírus dengue foi feita pelo método de TCID_{50%} (dose infectante em cultura de tecido a 50%) 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 foram descartados. As células foram tripsinizadas e 5 mL de meio MEM foi adicionado. As células foram ressuspensas e 4 mL da suspensão foram transferidos para um tubo FALCON®. As células foram diluídas em mais 8 mL de meio MEM, para se obter 1x10⁶ células em cada placa de microtitulação. Em cada um dos poços da placa foram adicionados 50 µL da suspensão de células VERO. As amostras dos sorotipos do vírus foram diluídas em meio MEM não suplementado e 50 µL das diluições virais foram colocadas junto às células. As microplacas foram incubadas em incubadora tipo BOD a 37°C por, no máximo,

72 horas. As células foram observadas em microscópio durante esse período para constatação do efeito citopático.

Purificação do vírus dengue: A purificação de ambos sorotipos do vírus dengue foi feita conforme protocolo gentilmente cedido pelo professor Maulori Cabral do Laboratório de Estruturas de Superfície de Vírus Envelopados e Interferons, IMPPG, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro e a seguir descrito. Cerca de 90 mL de sobrenadante de culturas de células infectadas foram recolhidos e adicionados de tampão tris - EDTA sódico, em concentrações finais de 2 mM pH 8,4. O material foi centrifugado a 7800 *g* por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante separado do sedimento e a ele foi adicionado NaCl para a concentração final de 0,5 M. A mistura foi mantida sob agitação por meia hora, seguindo-se a adição de PEG (polietileno glicol) 6000 a 40% em água, para a concentração final de 8%. O material foi mantido em banho de gelo por uma noite e centrifugado a 2000 *g* por 30 minutos. O sedimento foi imediatamente ressuspensso em solução de Tris 2 mM/EDTA a 1 mM contendo 10 % de sacarose, em volume 25 vezes menor do que o inicial. O material foi deixado 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%) de tartarato de sódio e potássio em tampão PBS-glicerol 8% v/v e ultracentrifugado em centrífuga Beckman a 150.000 *g* por duas horas, rotor SW 50.1. A banda esbranquiçada foi coletada com microseringa e dialisada contra tampão PBS-glicerol a 8% v/v por uma noite. Os frascos dos vírus purificados foram rotulados e guardados em ultracongelador à -80°C.

2.1 Infectividade e sorotipagem das partículas virais purificadas

Imunofluorescência indireta: As amostras de vírus purificados foram examinadas por imunofluorescência indireta, segundo protocolo gentilmente cedido pela Dra. Sueli Rodrigues, do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. Células de *Aedes albopictus* infectadas com os dois sorotipos foram tripsinizadas e ressuspenssas em meio D-MEM. Em seguida, foram centrifugadas em centrífuga Sorvall RC-5B a 1900 *g* por 10 minutos. O meio foi descartado, as células ressuspensas em um novo volume e novamente centrifugadas. Após a segunda lavagem o sedimento de células foi ressuspensso em uma quantidade pequena de PBS e um esfregaço foi feito em

lâminas de vidro. As células foram deixadas a temperatura ambiente para secagem seguindo-se fixação por 30 minutos em paraformaldeído a 4% p/v e adição dos anticorpos monoclonais contra os sorotipos den-1 (cepa Hawaii-D2-1F1-3/TCF) e den-2 (cepa Nova Guiné C-3H5-1-21/TCF). As lâminas ficaram mantidas em câmara-úmida por 30 minutos a 37°C. Logo após a adição do primeiro anticorpo, foram efetuadas duas lavagens das lâminas com PBS por 10 minutos, e uma lavagem em água destilada. Com as lâminas secas, foi adicionado o segundo anticorpo marcado, com isoticianato de fluoresceína (FIT-C), e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, na ausência de luz. Seguiram-se novas lavagens em PBS e em água e, após a secagem, as lâminas foram cobertas com glicerol e lamínula. A observação foi feita em microscópio de fluorescência.

3. CONSTRUÇÃO DO CONJUGADO VÍRUS-Fab

Conjugação da proteína viral aos fragmentos Fab. Conjugaram-se as proteínas virais aos fragmentos Fab segundo O'SULLIVAN e MARKS (1981). A técnica utiliza o glutaraldeído como agente ligante entre os aminogrupos dos fragmentos Fab e aqueles presentes nas proteínas do envelope viral. A amostra de vírus purificada foi lavada em concentrador Amicon® utilizando-se membrana de 100 µm, para permitir a saída da albumina, uma vez que as amostras de vírus estavam em tampão PBS-albumina a 0,4% p/v. Em seguida, 100 µL da amostra de Fab (concentração protéica 5mg/mL) foi misturada a 200 µL da suspensão de vírus (concentração protéica 1 mg/0,4 mL). Foram adicionados 6 µL de glutaraldeído, para uma concentração final de 0,2%. O material foi mantido por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Decorridas duas horas o conjugado foi dialisado contra PBS pH 7, 2, com troca de tampão.

RESULTADOS

1. PRODUÇÃO DO ANTI-SORO ANTI-HEMÁCIAS HUMANAS

As injeções das hemácias humanas em coelhos por via intravenosa (i.v.) resultaram em títulos de anticorpos equivalentes a 4 vezes (1024) aos obtidos com as injeções intramusculares (i.m.) (256), em período de tempo menor (Quadro 2).

Quadro 2: Titulação dos anti-soros anti-hemácias humanas de dois grupos de coelhos pela técnica de hemaglutinação com suspensão de hemácias a 2% de diferentes tipos sanguíneos. Linha **A**: diluições seriadas do anti-soro contra suspensão de hemácias A⁺; **B**: diluições seriadas do anti-soro contra suspensão de hemácias B⁺; **C**: diluições seriadas do anti-soro contra suspensão de hemácias A⁺ e B⁺; **D**, colunas 1, 2 e 3: anti-soro puro e suspensão de hemácias A⁺; **D**, colunas 4, 5 e 6: anti-soro puro e suspensão de hemácias B⁺; **D**, colunas 7, 8 e 9: anti-soro puro e suspensão de hemácias A⁺ e B⁺; **E**, coluna 1: suspensão de hemácias A⁺ em salina 0,85%; coluna 2: suspensão de hemácias B⁺ em salina 0,85%; coluna 3: suspensão de hemácias A⁺ e B⁺ em salina 0,85%

- Grupo A (Injeção intramuscular)

	Diluições do anti-soro											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
E	-	-										

Título: 256

- Grupo B (Injeção intravenosa)

	Diluições do anti-soro											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
E	-	-										

Título: 1024

1.1 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE IgG

O anti-soro obtido foi examinado para caracterização das imunoglobulinas presentes. O tratamento do anti-soro com β -mercaptoetanol permitiu diferenciar entre imunoglobulinas das classes δ e μ , sabido que este produto desfaz a estrutura pentamérica da IgM. A caracterização das imunoglobulinas feita pela técnica de hemaglutinação na presença ou ausência de um agente redutor mostrou que, independentemente da forma de inoculação a partir da qual o anti-soro foi obtido, a maioria das imunoglobulinas presentes pertence à classe IgG (Quadro 3).

Quadro 3: Presença de imunoglobulinas G segundo o teste de hemaglutinação dos anti-soros tratados ou não com o β -mercaptoetanol e provenientes de coelhos dos dois grupos. Linha **A**: diluições do anti-soro dos animais do grupo A na ausência do agente redutor; **B**: diluições do anti-soro dos animais do grupo B na ausência do agente redutor; **C**: diluições do anti-soro dos animais do grupo A na presença do agente redutor; **D**: diluições do anti-soro dos animais do grupo B na presença do agente redutor; **E**, colunas 1,2 e 3: anti-soro puro dos animais do grupo A e salina 0.85% na presença do agente redutor; colunas 4, 5 e 6: anti-soro puro dos animais grupo B e salina 0.85% na presença do agente redutor. As hemácias utilizadas eram do grupo sanguíneo A, fator Rh⁺

	Diluições do anti-soro											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.2 OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G PURAS

Para se chegar aos fragmentos Fab, as imunoglobulinas presentes no anti-soro dos coelhos foram primeiramente purificadas. A purificação por precipitação utilizando a técnica do ácido caprílico e sulfato de amônio não permitiu obter IgG totalmente puras, pois as amostras ainda continham proteínas contaminantes de alto peso molecular (Figura 1).

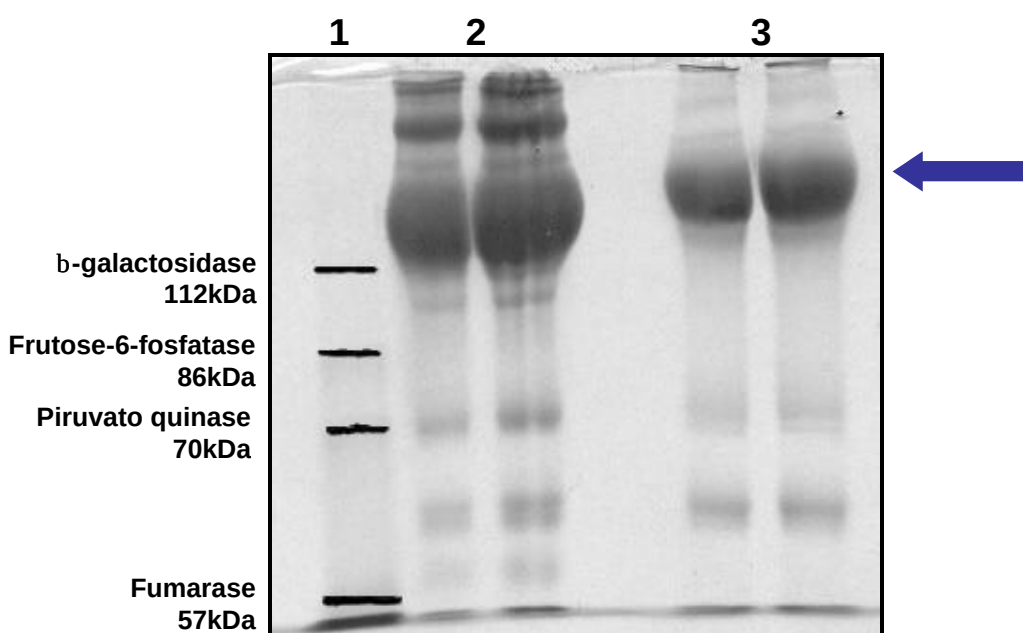


Figura 1: Perfil eletroforético em gel de poliácridamida a 12% da IgG de coelho anti-hemácia humana purificada por precipitação. As linhas enumeradas 2 e 3 correspondem a IgG precipitada com ácido caprílico e sulfato de amônio. As amostras em 2 foram precipitadas duas vezes a mais com sulfato de amônio, 33% de saturação. A linha 1 indica os padrões de alto peso molecular. A seta indica a IgG presente nas amostras.

A maior quantidade de proteína presente nas linhas 2 deve-se ao fato da purificação ter sido feita a partir de um volume de anti-soro cerca de três vezes maior do que nas amostras enumeradas como 3. O padrão de bandas apresentado nas linhas 2 e 3 foram similares, mostrando que as precipitações adicionais com sulfato de amônio realizadas com as amostras número 2 não levaram a um maior grau de pureza.

A molécula de IgG humana íntegra tem peso molecular de 150 kDa (FLEISCHMAN et al., 1962) e possivelmente, a banda indicada pela seta corresponda a IgG presente no anti-soro dos animais que não foi reduzida pelo β -mercaptoetanol na concentração adicionada ao tampão de amostra. As bandas de pesos moleculares entre 60 e 70 kDa provavelmente correspondem a cadeias peptídicas resultantes da redução da IgG e outras proteínas contaminantes de alto peso molecular pelo agente redutor β -mercaptoetanol.

No método de purificação da IgG por cromatografia utilizando coluna de proteína A-Sepharose (Figura 2) foram obtidas moléculas de IgG (Quadro 4) com grau de pureza adequado para a realização dos experimento seguintes.

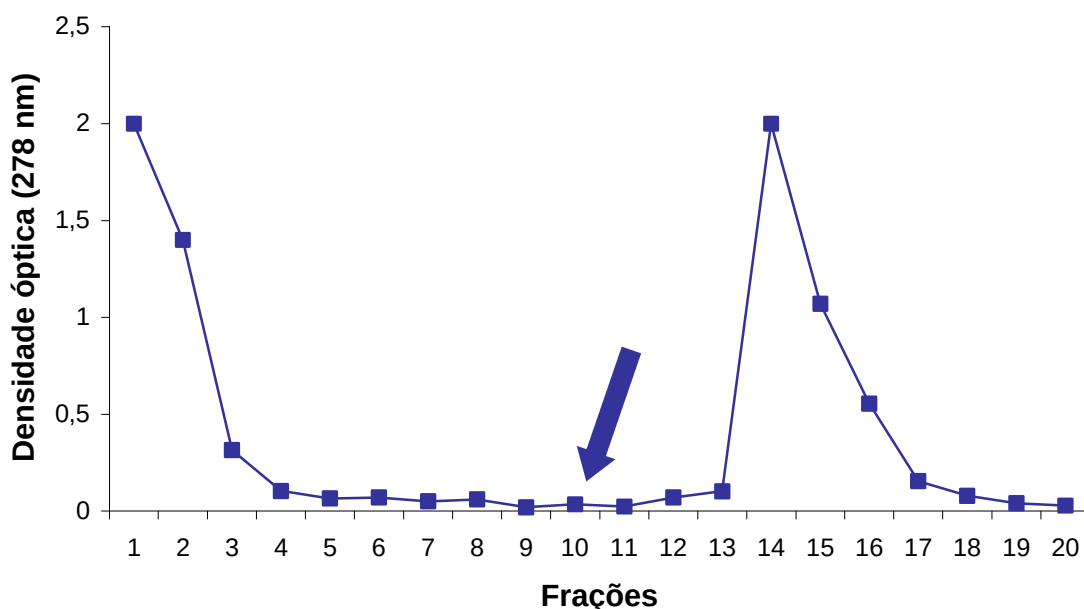


Figura 2: Purificação de IgG em coluna de proteína A-Sepharose a partir de anti-soro de coelho imunizado com hemácias humanas. O primeiro pico compreende as frações de 1-5 das proteínas do soro eluídas com PBS. A seta indica o ponto em que foi adicionado o tampão glicina-HCl 0,2M pH 2,3. O segundo pico compreende as frações de 11-18 de IgG, eluídas após alteração do pH.

As frações de 1-5 e de 11-18 que correspondem a eluição de proteínas foram concentradas e examinadas por hemaglutinação para verificação da presença de IgG (Quadro 4). As amostras concentradas não sofreram

alterações nos seus títulos após o tratamento com β -mercaptoetanol, indicando a predominância de IgG.

Quadro 4: Titulação pela técnica de hemaglutinação, na presença de β -mercaptoetanol para constatação da presença de IgG nas frações concentradas de cada um dos picos observados na figura 2. Linha **A**: diluições das frações concentradas e tratadas com o agente redutor β -mercaptoetanol; **B**: diluições das frações concentradas sem tratamento com o agente redutor β -mercaptoetanol

a) Frações de 1-5 concentradas

		Diluições das amostras											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Título: 1024

b) Frações de 11-18 concentradas

		Diluições das amostras											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Título: 256

A amostra concentrada das frações de 1-5 (1024) apresentou título 4 vezes maior do que a amostra concentrada correspondente às frações 11-18 (256) provavelmente devido à saturação dos sítios ligantes da proteína A pelo Fc permitindo que moléculas de IgG presentes no soro policlonal fossem eluídas no tampão de pH neutro. Contudo a primeira amostra contém outras proteínas séricas além da IgG, conforme dados já descritos na literatura (GARVEY et al., 1977; RICHMAN et al., 1982) e, portanto, não foi utilizada nos experimentos seguintes. A amostra correspondente as frações de 11-18 apresentou grau de pureza adequado para sua utilização nos próximos experimentos.

A purificação das IgGs anti-hemácias humanas utilizando coluna cromatográfica de troca-iônica (Figura 3) permitiu a obtenção de moléculas de IgG (Quadro 5) com grau de pureza similar ao obtido pelo método de cromatografia de afinidade (Figura 6), porém o título alcançado pela cromatografia de troca iônica foi equivalente a 2 vezes o obtido na cromatografia de afinidade (Quadro 6).

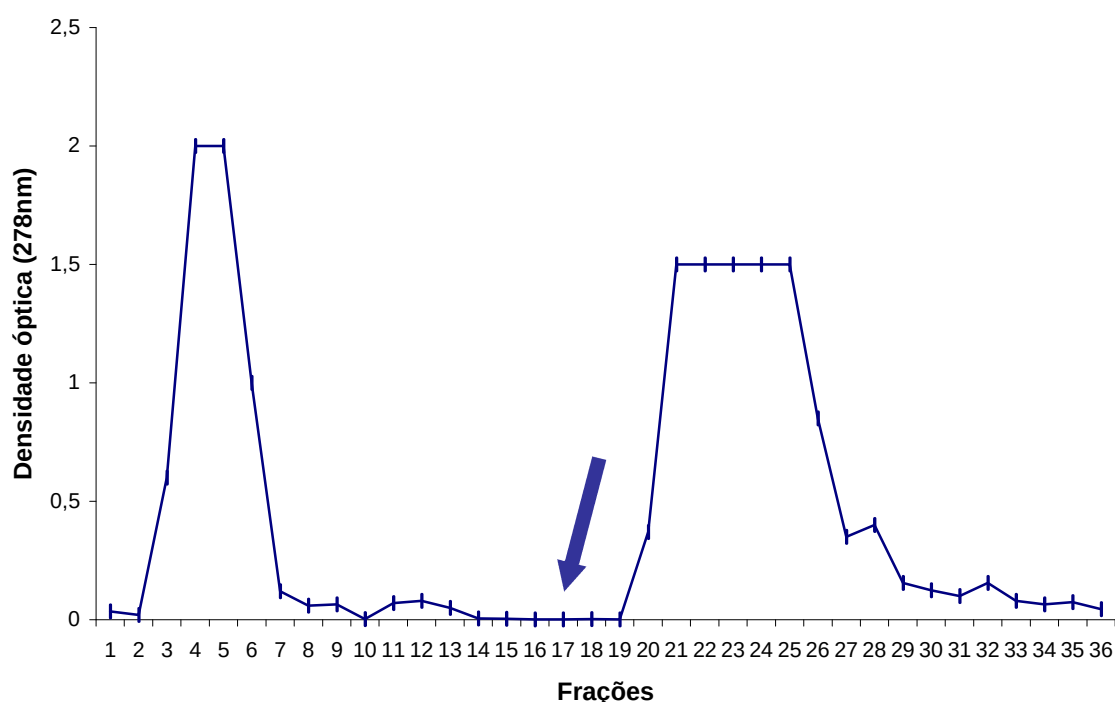


Figura 3: Purificação de IgG em coluna de DEAE-sepharose a partir de anti-soro de coelho imunizado com hemácias humanas. O primeiro pico, frações 2-9, corresponde a IgG eluída com o tampão PBS pH 6,4. A seta indica o ponto em que foi adicionada a solução de NaCl 1 M. Após a adição do sal, outras proteínas e imunoglobulinas como a IgM, e IgGs restantes são eluídas.

Todas as frações coletadas após passagem pela coluna foram testadas por hemaglutinação para verificação quanto à presença de imunoglobulina aglutinante (Quadro 5) .

Quadro 5: Presença de IgG nas frações eluídas da coluna de DEAE-sepharose, sem tratamento com o agente redutor β -mercaptoetanol. Cada fração foi testada contra suspensão de hemácias A⁺ a 2%. A adição de NaCl a 1 M ocorreu a partir da fração 18

Frações obtidas da coluna											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A IgG purificada é eluída nas primeiras frações pelo tampão PBS por não se ligar a matriz carreadora de ânions (GARVEY et al., 1977). As frações de 1-9 que apresentaram atividade aglutinante (Quadro 5) foram concentradas e testadas por hemaglutinação na presença do agente redutor para constatação da presença de IgG (Quadro 6).

Quadro 6: Teste de hemaglutinação realizado com as frações 1-9 (Quadro 5) concentradas com o objetivo de verificar a presença de IgG mas não de IgM. Linha **A**: diluições da amostra concentrada em salina 0.85% após tratamento com β -mercaptoetanol e adição de suspensão de hemácias a 2%; **B**: diluições da amostra concentrada em salina 0.85% e adição de suspensão de hemácias a 2%

Diluições das amostras												
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

O título de 512 da amostra concentrada não sofreu alteração mesmo após o tratamento com β -mercaptoetanol, indicando a presença de IgG. As frações de 1-9 contêm a IgG com grau de pureza suficiente para os

experimentos seguintes, além de apresentar um título equivalente a duas vezes o observado na purificação em coluna de cromatografia de afinidade (Quadro 4).

As frações de 21-27 (Figura 3; quadro 5) foram tratadas com β -mercaptoetanol e testadas por hemaglutinação. A atividade aglutinante foi mantida, sugerindo a presença de IgG (resultados não mostrados), contudo de acordo com dados na literatura (HUDSON e HAY, 1979; HARLOW e LANE, 1988), após a adição do NaCl, as frações eluídas contêm outras proteínas do soro e dessa forma, as frações de 21-27 foram descartadas.

1.3 OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS Fab

A IgG purificada sofreu digestão enzimática pela papaína para obtenção de fragmentos Fab. A separação dos fragmentos Fab de moléculas de IgGs íntegras e fragmentos Fc presentes na mistura de reação, foi inicialmente feita por cromatografia de afinidade utilizando matriz de proteína A-sepharose (Figura 4).

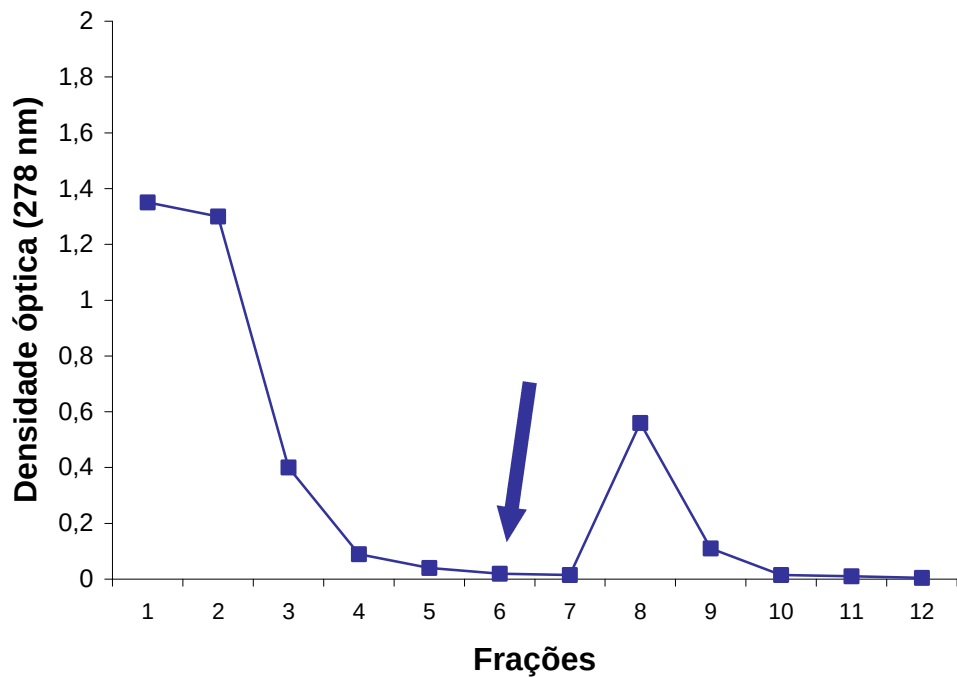


Figura 4: Cromatografia de imunoafinidade utilizando coluna de proteína A-Sepharose para separação dos fragmentos Fab presentes na amostra de IgG após digestão com papaína. As frações do primeiro pico correspondem aos Fabs e a papaína. O segundo pico, ao Fc e possíveis IgGs íntegras. A seta indica o início da adição do tampão glicina-HCl 0,2 M pH 2,3.

A papaína (PM 21 kDa) foi separada dos fragmentos Fab (PM 50kDa) em concentrador Amicon® utilizando membrana de 30 μ m (dados não mostrados).

Após a retirada da papaína da amostra concentrada das frações de 1-5, o material foi testado por hemaglutinação para a presença de Fabs (Quadro 7), a qual poderia ser verificada pela ausência de hemaglutinação. Entretanto, o título (32) apresentado pela amostra (Linha A; quadro 7) sugere a presença de contaminantes capazes de aglutinação, como moléculas de IgG íntegras eluídas com o tampão de pH neutro provavelmente devido à saturação dos sítios da proteína A.

Quadro 7: Títulos por hemaglutinação para a presença de Fabs na amostra retida no concentrador Amicon® após retirada da papaína. Linha **A**: diluições da amostra retida, frações 1-5; **B**: diluições da amostra concentrada correspondente as frações de 7-10, após passagem em coluna de proteína A-sepharose (Figura 4)

		Diluições da amostra											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A verificação da pureza da amostra quanto à presença Fab foi feita por imunoeletroforese (Figura 5).

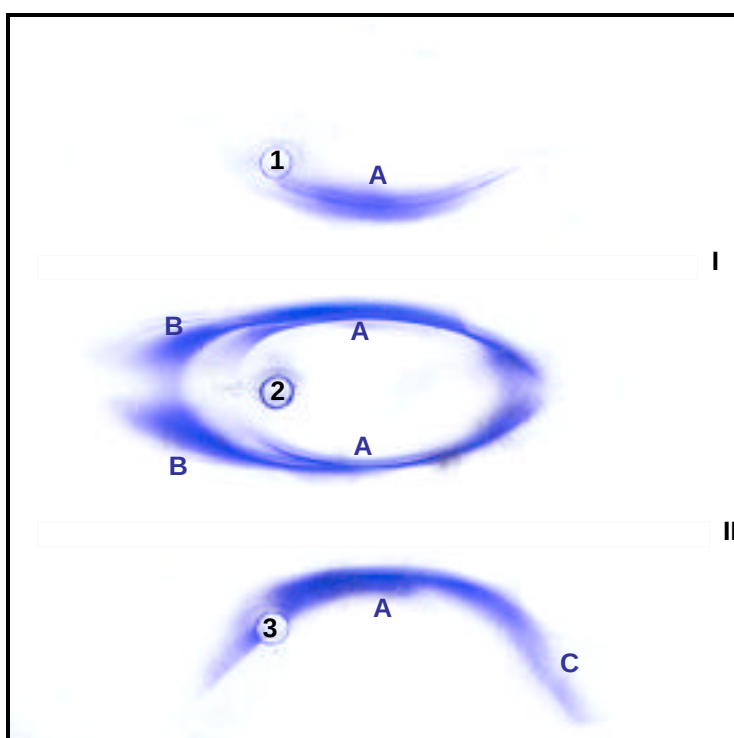


Figura 5: Imunoeletroforese de Williams e Grabar de IgG após clivagem com papaína. No orifício 1 foram colocados 5 µL de IgG de coelho. No orifício 2 foram colocados 5µL da amostra concentrada correspondente às frações 1-5, após retirada da papaína; o orifício 3 foi preenchido com uma amostra concentrada das frações 7 a 10. Anti-soro de cabra anti-IgG de coelho foi colocado nas canaletas I e II. A=banda correspondente a IgG; B=banda correspondente ao Fab; C=banda correspondente ao Fc.

A retirada das imunoglobulinas íntegras presentes na amostra de Fab foi feita em concentrador Amicon® utilizando membrana de 100 µm. A separação das imunoglobulinas em concentrador Amicon® mostrou-se mais eficiente do que a cromatografia de afinidade utilizando membrana de proteína A-Sepharose (Quadro 8; figura 6).

Quadro 8: Hemaglutinação utilizando hemácias a 1% a fim de verificar a presença de fragmentos Fab na amostra concentrada. Linha **A**: amostra de Fab após eluição em coluna de proteína A-sepharose; **B**: amostra de Fab após concentração em Amicon® usando membrana de 100 µm; **C**: amostra de Fab concentrada em Amicon® usando membrana de 100 µm após 4 horas

	Diluições das amostras											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

A aglutinação observada na linha C possivelmente ocorreu pela reassociação dos fragmentos Fab, originando fragmentos F(ab)₂ pela não adição de um bloqueador como a iodoacetamida. A utilização das amostras de fragmentos Fab para as próximas etapas foi feita imediatamente após a purificação em concentrador Amicon®.

A constatação da presença de apenas fragmentos Fab na amostra (Linha B; quadro 8) demonstrada pelo padrão das bandas, foi feita pela técnica de imunodifusão dupla radial (Figura 6). A imunodifusão dupla radial, demonstra a identidade entre as amostras de IgG aplicadas nos orifícios 1 e 2. Identidade parcial verificada entre as amostras dos orifícios 1 e 4 indica a presença de IgG íntegra na amostra concentrada das frações de 7 a 10 purificadas por cromatografia em coluna de proteína A-sepharose. Esse resultado condiz ao observado na figura 5. A formação do esporão entre as amostras identifica a fração Fc. A amostra aplicada no orifício 3 não apresentou identidade com a amostra 2, mostrando que foi eficiente a separação dos Fabs das IgGs em concentrador Amicon®. O esporão formado entre elas deixa clara a presença de Fabs na amostra.

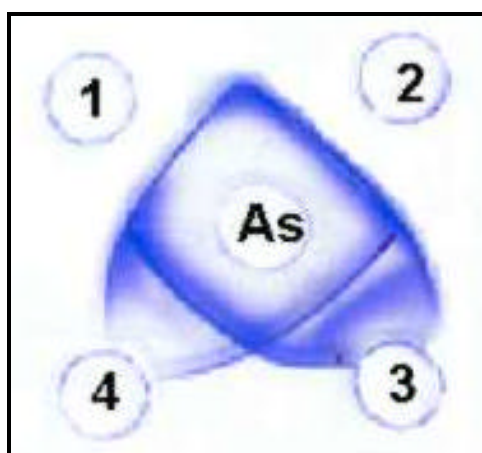


Figura 6: Imunodifusão dupla radial das amostras de IgGs, Fab e Fc. Orifício **1**: IgG purificada por cromatografia de troca iônica; **2**: IgG purificada por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose; **3**: amostra concentrada em concentrador Amicon® com membrana de 100 μm (Linha B; quadro 8); Orifício 4: Amostra concentrada das frações 7 a 10 passada através da coluna de proteína A-sepharose (Linha B; quadro 7). No orifício central, foram adicionados 20 μL do anti-soro de cabra anti-IgG de coelho.

2. PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2

A purificação dos dois sorotipos de dengue segundo a técnica com ultracentrifugação de gradiente de densidade contínuo de tartarato de sódio e potássio de 20 a 45% foi eficiente. A banda esbranquiçada e nítida no tubo (Figura 7) foi coletada e colocada em culturas de células de mamíferos e mosquitos. O efeito citopático observado após o período determinado para cada cultura demonstra que as partículas virais mantiveram a infectividade (Figura 8).

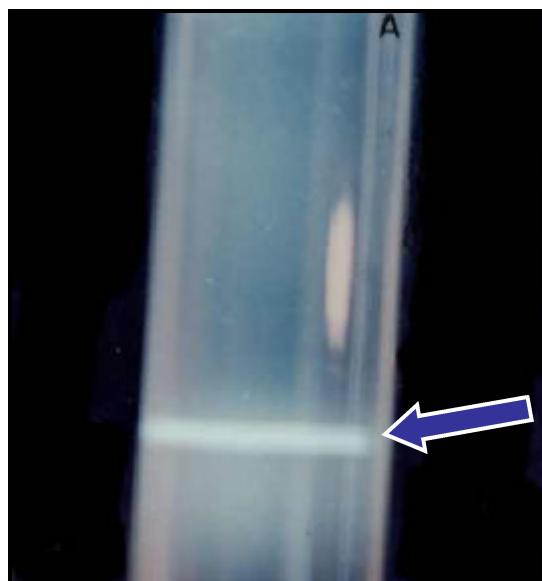


Figura 7: Banda de vírus (seta) após ultracentrifugação em gradiente contínuo de tartarato de sódio e potássio, 20 a 45% p/v.

2.1 INFECTIVIDADE E SOROTIPAGEM DAS PARTÍCULAS VIRAIS PURIFICADAS

A técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais para os sorotipos den-1 e den-2 permitiu isolar e caracterizar os sorotipos (Figura 8). A constatação do efeito citopático e a fluorescência reforçada na região perinuclear são características da infecção viral, demonstrando que as partículas virais purificadas permaneceram infecciosas.

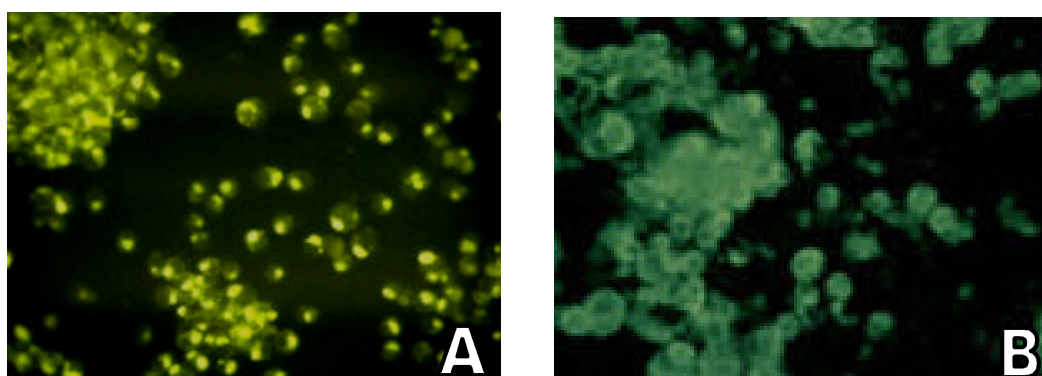


Figura 8: Imunofluorescência indireta para identificação dos sorotipos den-1 e den-2 em culturas de células de mosquitos *Aedes albopictus*. **A:** Reação positiva para sorotipo den-1; **B:** Reação positiva para den-2.

3. CONSTRUÇÃO DO CONJUGADO VÍRUS-Fab

O glutaraldeído foi utilizado como agente acoplador entre os fragmentos Fab e os vírus purificados. A fim de verificarmos a funcionalidade do conjugado, foram realizadas titulações por hemaglutinação. Os resultados no quadro 9 mostram que o conjugado vírus-Fab pode ter sido o responsável pela elevação em 8 vezes do título da aglutinação das hemácias a 1% quando comparado à presença apenas do vírus (Quadro 9).

Quadro 9: Resultado da hemaglutinação utilizando conjugado vírus-Fab em diferentes concentrações de hemácias humanas, grupo sanguíneo O, fator Rh⁻. Linha **A**: diluições da amostra de vírus purificado; **B**: diluições seriadas do conjugado vírus-Fab

9.1) Hemácias 1%

	Diluições das amostras											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2046	1:4092
A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

9.2) Hemácias 2%

	Diluições das amostras											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2046	1:4092
A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No quadro 10, os anticorpos humanos, negativo e positivo para dengue, não foram capazes de aglutinar as hemácias humanas em nenhuma das diluições, não gerando falsos positivos. O vírus diluído 1:4 na presença de anti-soro negativo para dengue (Linha C) aglutinou as hemácias nas diferentes diluições do anti-soro por não existirem anticorpos capazes de impedir a ligação da hemaglutinina viral às hemácias. O anticorpo positivo para dengue na presença do vírus (Linha D) ligou-se à partícula viral, impedindo, alostericamente, a reação da hemaglutinina com as hemácias levando a uma diminuição no título aglutinante equivalente a 512 vezes. Somente a partir da diluição 1:16, as quantidades de anticorpo e vírus foram equivalentes para

impedir a aglutinação das hemácias. Na linha E o anti-soro negativo para dengue não apresenta anticorpos capazes de se ligar ao vírus, portanto não impediu a aglutinação das hemácias pelo conjugado vírus-Fab em concentração fixa de 1:16. Na linha F o anticorpo positivo para dengue impediu a aglutinação das hemácias nas menores diluições por se ligar ao conjugado. Acima da diluição 1:64, a quantidade de anticorpo tornou-se inferior a quantidade de antígeno (vírus-Fab). As diluições do conjugado na linha G apresentam aglutinação positiva até a diluição 1:64. Nas diluições maiores, o resultado negativo deve-se a diminuição na concentração do conjugado vírus-Fab e a ausência de anticorpos positivos para o vírus. Na linha H, o anticorpo positivo para dengue ligou-se ao vírus conjugado, conseguindo inibir a aglutinação das hemácias pelo conjugado vírus-Fab nas maiores diluições. Nas diluições 1:2; 1:4 e 1:8 a quantidade de anticorpo é inferior a quantidade de antígeno (vírus-Fab) permitindo a aglutinação das hemácias.

Quadro 10: Resultado do teste de hemaglutinação utilizando suspensão de hemácias humanas pertencentes ao grupo sanguíneo O fator Rh⁻ a 1% em solução salina 0,85%. De **A** a **H**: diluições seriadas: **A** de anti-soro humano doador negativo para dengue; **B** de anti-soro humano doador positivo para dengue; **C** do anti-soro negativo para dengue na presença do vírus purificado diluído 1:4; **D** do anti-soro positivo para dengue na presença do vírus purificado diluído 1:4; **E** do anti-soro negativo para dengue na presença do conjugado diluído 1:16; **F** do anti-soro positivo para dengue na presença do conjugado diluído 1:16; **G** do conjugado na presença do anti-soro negativo para dengue diluído 1:10; **H** do conjugado na presença do anti-soro positivo para dengue diluído 1:10

	Diluições seriadas											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2046	1:4096
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DISCUSSÃO

A dengue é a doença mais importante causada por um flavivírus no mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais onde a doença é um grave problema de saúde pública (DE PAULA, 2002b; FONSECA & FONSECA, 2002). A Organização Mundial de Saúde, com o intuito de prevenir esta doença, estabeleceu um sistema de vigilância ativa onde métodos diagnósticos rápidos e precisos adquirem fundamental importância tanto para o controle epidemiológico quanto para o tratamento e profilaxia da dengue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; 1999)

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica de hemaglutinação passiva capaz de detectar anticorpos antidengue em sangue humano total pela síntese de um conjugado vírus dengue-Fab anti-hemácias humanas. Ao ser adicionado a uma amostra de sangue soropositiva para dengue, este conjugado aglutina as hemácias pela formação de malha de precipitação entre os anticorpos antidengue e as partículas virais do conjugado. Em amostras negativas, a aglutinação não ocorre pela ausência dos anticorpos antidengue.

A técnica de inibição da hemaglutinação (HI) foi por muitos anos o teste sorológico padrão para o diagnóstico e classificação da infecção pelo vírus dengue (MIAGOSTOVICH et al., 2001), entretanto foi substituída na maioria dos laboratórios por “kits” diagnósticos imunoenzimáticos, os quais permitem a análise de uma série de amostras com resultados relativamente rápidos, a

exemplos o Pan Bio® “kit dengue-teste rápido em tiras” e o Pan Bio® “INDX dengue micro ELISA” (MEDIVAX, 2000).

“Kits” de diagnóstico rápido para doenças baseados na técnica de hemaglutinação passiva têm sido aperfeiçoados. HYLLYARD et al. (1996) em conjunto com empresas privadas, desenvolveram um método para o diagnóstico de doenças veterinárias cardíacas e virais como AIDS, realizado em sangue total, com visualização dos resultados em alguns minutos e sensibilidade e especificidade comparáveis a “kits” comerciais imunoenzimáticos. Testes rápidos de hemaglutinação passiva desenvolvidos para hepatites B e C apresentam sensibilidade de 5-10 ng/mL e são comparados aos métodos de radioimunoensaio (VIZCARRAPHARMA, 2003).

Inicialmente, a produção de anti-soro anti-hemácias humanas alcançou maiores títulos (≤ 1024) de imunoglobulinas em menor tempo (15 dias) quando as injeções nos coelhos ocorreram por via i.v (Quadro 2), resultados similares aos já descritos na literatura (GARVEY et al, 1977; CATTY, 1990a).

Na caracterização das imunoglobulinas presentes no anti-soro anti-hemácias humanas constatou-se a presença de IgG aglutinante e não de IgM, independentemente do método de inoculação utilizado (Quadro 3). O β -mercaptoetanol é um agente redutor que desfaz pontes dissulfídicas e na concentração utilizada destrói a estrutura pentamérica da IgM diminuindo, portanto, a capacidade aglutinante dessa imunoglobulina (GARVEY et al., 1977).

A IgM tem uma maior capacidade aglutinante do que a IgG em razão da sua estrutura pentamérica (ABBAS, 2002) e o funcionamento do método proposto pode ser prejudicado por permitir a ocorrência de falsos positivos, uma vez que a IgM *per si* é capaz de aglutinar as hemácias. Além disso, a obtenção de fragmentos Fab, de interesse no desenvolvimento do método proposto, é descrita a partir da clivagem enzimática de moléculas de IgG (GARVEY et al., 1977; HUDSON & HAY, 1979; HARLOW & LANE, 1988; CATTY, 1990a).

A purificação da IgG presente no soro policlonal por técnicas de cromatografia permitiu a obtenção de imunoglobulinas mais puras (Figura 6) quando comparadas à técnica de precipitação utilizando ácido caprílico e sulfato de amônio (Figura 1), inclusive as amostras precipitadas duas vezes a mais com o sulfato de amônio (Linhas 2, figura 1).

Durante o desenvolvimento da técnica de precipitação, proteínas de alto peso molecular, assim como outras proteínas, são carregadas nos precipitados formados, contaminando a amostra (HARLOW & LANE, 1988). A presença de outras proteínas (Figura 1) que não IgG poderia alterar os resultados das próximas etapas de construção do conjugado, portanto as amostras precipitadas foram descartadas. O acoplamento da técnica de precipitação a uma segunda, a exemplo da cromatografia, permite a obtenção de melhores resultados (HARLOW & LANE, 1988), contudo tal comparação não foi verificada no trabalho.

Entre as técnicas cromatográficas, os resultados mostraram que a cromatografia utilizando matriz de troca iônica foi mais eficiente na obtenção de IgG (Título=512; quadro 6) quando comparado à purificação utilizando matriz de proteína A-sepharose (Título=256; quadro 4), porém o grau de pureza das moléculas de IgG obtidas em ambos foi semelhante (Figura 6).

A purificação de anti-soro de coelho por cromatografia de afinidade utilizando matriz de proteína A-sepharose garante bons resultados uma vez que a proteína A de *Staphylococcus aureus* tem grande afinidade pelo fragmento Fc da molécula de IgG de coelho (RICHMANN et al., 1982). Entretanto na comparação de uma série de métodos de purificação de anticorpos por HARLOW & LANE (1988), eles concluíram por não recomendar o uso de colunas de afinidade anti-Ig para purificação de anti-soro de coelhos, embora tenham classificado como a pura a IgG obtida de cromatografias de imunoafinidade utilizando proteína A.

O método de purificação por troca iônica em DEAE-sepharose é considerado como adequado para a purificação de anticorpos de coelhos, porém não é suficiente para purificação de IgG humana (HUDSON & HAY, 1979). GARVEY et al. (1977) descrevem o método como bastante simples para obtenção de IgG purificada e HARLOW & LANE (1988) classificam como pura a IgG obtida por cromatografia de troca iônica, entretanto sugerem o acoplamento desse método a um outro, a exemplo das precipitações.

Nos resultados apresentados, os dois tipos de purificação cromatográfica, permitiram obter moléculas de IgG com grau de pureza adequado para a realização dos experimentos seguintes. A proposta de substituição de anti-soro policlonal pela utilização de anticorpos monoclonais contra hemácias humanas poderia eliminar as etapas de purificação das

moléculas de IgG, reduzindo tempo e custos na produção, além de facilitar a obtenção dos fragmentos Fab.

As moléculas de Fab obtidas após a clivagem da IgG com papaína e retirada de IgGs íntegras contaminantes na amostra em concentrador Amicon® (Quadro 8), voltaram a apresentar atividade aglutinante decorrida quatro horas (Linha C; quadro 8). Possivelmente, a não adição de um agente bloqueador permitiu que os fragmentos Fab se reassociassem, originando fragmentos F(ab)₂.

Smith & Utsumi (1967) utilizaram a iodoacetamida como agente bloqueador dos resíduos de enxofre após a clivagem enzimática da IgG com papaína para evitar a reassociação das pontes dissulfídicas entre os fragmentos Fab e a formação de fragmentos F(ab)₂, estruturas capazes de aglutinação. HILLYARD et al (1986) utilizaram o 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) como agente redutor de fragmentos F(ab)₂ originados da clivagem da molécula de IgG por pepsina, e como bloqueador dos fragmentos Fab formados.

A formação de F(ab)₂ não é de interesse para o método de aglutinação passiva por serem moléculas capazes de aglutinação sem estarem associadas à partícula viral, gerando, portanto, resultados falsos positivos. A fim de evitar a formação de F(ab)₂ a amostra foi utilizada imediatamente após sua purificação em concentrador Amicon®. Em futuros experimentos, a adição do agente bloqueador torna-se necessária a fim de evitar tais problemas.

As partículas virais dos sorotipos den-1 e den-2 mantiveram suas capacidades de infecção mesmo após o processo de purificação, visto que os resultados da técnica de imunofluorescência indireta mostraram-se positivos para ambos. A observação de intensa fluorescência na região perinuclear é um outro indício da presença de vírions, uma vez que a replicação em massa dos vírus dengue ocorre na região perinuclear (BARTH, 2000; BROOKS et al., 2000).

Nos ensaios para constatação da construção do conjugado, quantidades equivalentes de Fab e vírus foram adicionadas a fim de que o maior número possível de fragmentos Fab se ligasse à partícula viral e, dessa forma, o conjugado formado *per si* fosse capaz de aglutinar as hemácias humanas. Nos primeiros testes de hemaglutinação (Quadro 9), o vírus dengue purificado foi capaz de aglutinar as hemácias a 1 e a 2% (Título=4). A

aglutinação observada pode ter ocorrido por ligações inespecíficas entre a hemaglutinina viral e proteínas de superfície nas hemácias do grupo sanguíneo O utilizadas no experimento. O vírus dengue aglutina hemácias de ganso e de humanos do grupo sanguíneo O (HECHAVARRIA, 2002). A substituição da partícula viral íntegra no conjugado por proteínas do envelope viral, como a proteína E para a qual a resposta imune é a mais intensa (RICE et al., 1986), evitar a ocorrência de falsos positivos em pacientes cujo sangue pertenceria ao grupo O. Em experimentos futuros a utilização de proteínas purificadas do envelope conjugadas aos fragmentos Fab pode ser recomendada, por aumentar a especificidade da técnica e facilitar as etapas de construção do conjugado.

A aglutinação observada na linha B do quadro 9.1 demonstra que o conjugado *per si* foi capaz de aglutinar as hemácias (Título=32), contudo reações inespecíficas entre o vírus dengue e as hemácias possivelmente também tenham ocorrido. Com base na diferença entre os títulos (Linhas A e B; quadro 9.1) é possível fazer a inferência de que a presença do conjugado vírus-Fab foi o principal responsável pela aglutinação.

A ausência de aglutinação nas diluições do conjugado quando a concentração de hemácias foi de 2% pode ser atribuída à inexistência de formação de malha de aglutinação a qual requer uma concentração mais ou menos equimolar entre os determinantes antigênicos e os sítios ligantes do anticorpo (Fab) (CALICH & VAZ, 1989; ABBAS et al. 20002). O aumento equivalente a duas vezes mais hemácias pode ter proporcionado um excesso de antígeno (hemácias) em relação à quantidade de conjugado vírus-Fab.

A capacidade de aglutinação do conjugado demonstra a possível conjugação dos fragmentos Fab à partícula viral quando se utiliza o glutaraldeído como agente acoplador. A reação de conjugação de proteínas com a utilização do glutaraldeído, além de apresentar uma eficiência baixa de conjugação, resulta na ocorrência de reações cruzadas uma vez que ambos os materiais a serem conjugados são proteínas (O'SULLIVAN & MARK, 1981). A ocorrência de reações cruzadas pode ter levado a formação de conjugados indesejáveis como ligações entre fragmentos Fab ou mesmo entre partículas virais. Essas estruturas poderiam ter auxiliado na aglutinação das hemácias (Linha B; quadro 9.1) levando a interpretações erradas de resultados. Dessa forma, outros estudos ainda são requeridos para se determinar a eficiência de

conjugação nesse processo de formação do conjugado vírus-Fab, a exemplo do estudo sobre a possibilidade do uso de outros agentes acopladores como o DTNB (HILLYARD et al., 1996). A utilização de sistemas de expressão para proteínas virais já acopladas aos fragmentos Fab poderia eliminar os problemas nas etapas de conjugação além de otimizar o funcionamento da técnica e a sua produção. Sistemas de expressão das proteínas pré-M, E, NS1 e NS3 de vírus dengue em baculovírus e bactérias foram desenvolvidos por pesquisadores do Paraná (SANTOS, 2002) e a expressão de fragmentos de anticorpos em bactérias contra uma série de antígenos já são conhecidos (TORRANCE, 1998).

A ligação dos fragmentos Fab à partícula viral, não impediu que os anticorpos antidengue se ligassem aos seus epítomos no vírus (Linhas F e H; quadro 10) e nem que os fragmentos Fab reconhecessem seus sítios de ligação na superfície das hemácias (Linha A; quadro 9.1; linhas E, F, G e H; quadro 10), pontos fundamentais para o funcionamento do método proposto.

Em estudos futuros a técnica deverá ser melhorada em sua especificidade e sensibilidade, para garantir ao método a capacidade de diferenciar entre os sorotipos virais em diferentes tipos de amostras, mesmo em espécimes coletados de indivíduos na fase de convalescência da doença.

CONCLUSÕES

O trabalho demonstrou a viabilidade do estabelecimento da técnica de hemaglutinação passiva para detectar anticorpos antidengue em amostras de soro e hemácias e sangue humano total quando se faz a construção do conjugado vírus dengue-Fab anti-hemácias humanas utilizando o glutaraldeído como agente acoplador, não ocorrendo durante o processo as alterações nos sítios de ligação dos fragmentos Fab e nem os problemas na partícula viral que impedissem a ligação dos anticorpos antidengue a seus epítomos. A utilização de sistemas de expressão para proteínas virais, sozinhas ou acopladas diretamente ao fragmento Fab, ou mesmo de anticorpos monoclonais em substituição ao anti-soro policlonal, podem otimizar a produção por reduzir tempo e custos, além de beneficiar o funcionamento da técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. e ROBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 486 p.

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

ARAÚJO, F. M. C.; DIÓGENES, E. A.; RAMALHO, I. L. C. e MELLO, L. P. The first cases of dengue serotype 3 isolated in Ceará, Brazil. In: XIII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: Imprinta Express, 2002. 190 p. v. 7, n. 1. p 101.

BARBOSA, M. L. Dengue: revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 27-45, 1996.

BARBOSA, M. L.; UEDA-ITO, M e ROCCO, I. M. Presença de vírus endógeno na linhagem celular *Aedes albopictus* clone C6/36 não infectadas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 57, n. 2, p. 31-33, 1998.

BARTH, O.M. **Atlas of dengue viruses morphology and morfogenesis**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N. e OLSON, K. E. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

BROOM, A. K.; HALL, R. A.; JOHANSEN, C. A.; OLIVEIRA, N.; HOWARD, M. A.; LINDSAY, M. D.; KAY, B. H. e MACKENZIE, J. S. Identification of Australian arboviruses in inoculated cell cultures using monoclonal antibodies in ELISA. **Pathology**, v. 30, p. 286-288, 1998.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S.; Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.375-393.

CALICH, V. L. G. e VAZ, C. A. C. **Imunologia básica**. São Paulo: Artes Médicas, 1989. 376 p.

CALISHER, C. H.; BRANDT, W. E.; CASALS, J.; SHOPE, R. E.; TESH, R. B. e WIEBE, M. E. Proposed antigenic classification of registered arboviruses. 1. Togaviridae, Alphaviridae. **Intervirology**, v. 14, p. 229-232, 1980.

a) CATTY, D. **Antibodies a practical approach**. Oxford: IRL, 1990. v. 1. 203 p.

b) CATTY, D. **Antibodies a practical approach**. Oxford: IRL, 1990. v. 2. 259 p.

CAUSEY, O. R. e MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human agent. III. Investigation of an endemic of acute febrile illness on the River Guamá in Pará, Brazil and isolation of Mayaro virus as a causative agent. **Am. J. Trop. Med.**, v. 6, p. 1017-1023, 1957.

CECÍLIO, A. B.; TRINDADE, G. S.; NOGUEIRA, M. L.; SANTOS, J. R.; JORGE, F. C. M.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A. e KROON, E. G. Natural transovarial transmission of dengue vírus type 2 in *Aedes aegypti*. In: XI Encontro Nacional de Virologia/ 3º Encontro de Virologia do MERCOSUL, 2000, São Lourenço, MG. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: C.C.R. Empresa Jornalística Ltda, 2000. 210 p. v. 5, n. 2. p 81.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of vector-borne infection disease Dengue fever**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/set1/v/slide02.htm>>. Acesso em: 25/09/2001.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R. e RICE, C. M. Vaccine development against dengue and japanese encephalitis: report of a world health organization meeting. **Vaccine**, v. 15, p. 1492-1502, 1997.

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

CORDEIRO, M. T. Epidemiologic, clinical and virologic observations on dengue in the state of Pernambuco, Brazil. In: XIII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: Imprinta Express, 2002. 190 p. v. 7, n. 1. p. 54.

a) DE PAULA, S. O.; LIMA, D. M. e FONSECA, B. A. L. Detection and identification of dengue-1 virus in clinical samples by a nested-PCR followed by restriction enzyme digestion of amplicons. **Journal of Medical Virology**. V. 66, p. 529-534, 2002.

b) DE PAULA, S. O.; PIRES NETO, R. J.; CORRÊA, J. A. C. T.; ASSUMPÇÃO, S. R., COSTA, M. L. S.; LIMA, D. M. e FONSECA, B. A. L. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 96, p. 266-269, 2002.

DE PAULA, S. O.; NUNES, C. G.; MATOS, R. F.; OLIVEIRA, Z. M.; MALTA, D. L. e FONSECA, B. A. L. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**. v. 98, p 119-125, 2001.

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

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

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1643-1619, 2000.

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

FLEISCHMAN, R.; PAIN, R. H. e PORTER, R. R. Reduction of γ -globulins. **Archives of Biochemistry Supplement** 1, p. 174-180, 1962.

FLINT, S. J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R. e SKALKA, A. M. **Principles of virology molecular biology, pathogenesis, and control**. Washington: ASM Press, 2000. 804 p.

FONSECA, B. A. L. e FONSECA, S. N.S. Dengue virus infections. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 14, p. 67-71, 2002.

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

FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L. e 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.

GARVEY, J. S.; CREMER, N. E e SUSSDORF, D. H. **Methods in Immunology**. 3 ed. EUA: Addison-Wesley Publishing Company, 1977.

GUBLER, D. J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 571-578, 1989.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue hemorrhagic fever as a global public health problema in the 21st century. In: XIII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: Imprinta Express, 2002. 190 p. v. 7, n. 1. p. 22.

GUBLER, D. J. e SATHE, R. **Laboratory diagnosis of dengue and dengue haemorrhagic fever**, In "Proceedings of the international symposium on yellow fever and dengue", Cuba, p. 291-322, 1988.

GUBLER, D. J.; SUHARYONO, W.; SUMARMO; WULUR, H.; JAHJA, E. e SAROSO, J. S. Virological surveillance for dengue haemorrhagic fever in Indonesia using the mosquito inoculation technique. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, n. 6, p. 931-936, 1979.

GUBLER, D. J. e TRENT, D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infect. Agents Dis**, v. 2, p. 283-293, 1994.

GUNASEGARAN, K.; LIM, T. W.; AHMED, A.; AASKOV, J. G.; LAM, S. K. e PANG, T. Hemadsorption immunosorbent technique for the detection of dengue immunoglobulin M antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 170-174, 1986.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **Rapp. Trimest. statist. sanit. mond.**, v. 45, p. 292-297, 1992.

HARLOW, E. e LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1998. 726 p.

HARRIS, E.; SANDOVAL, E.; JOHNSON, M.; XET-MULL, A. M. e RILEY, L. W. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. **Virology**, v. 253, p. 86-95, 1999.

HECHAVARRIA, A. B. **Manual de procedimientos de técnicas para el diagnostico del dengue**. Nicaragua: Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud, 2002. 72 p.

HENCHAL, E. A., NARUPITIS, R., FEIGHNY, R., PADMANABHAN, R. e VAKHARIA, V. Detection of dengue virus RNA using nucleic acid hybridization. **J. Virol. Methods**, v. 15, p. 187-200, 1987.

HENRIQUES, D. A. e MEZENCIO, J. M. S. **Estabelecimento de parâmetros ideais para o uso de “imunodot blot” na verificação da presença do vírus Mayaro em mosquitos na região de Viçosa (MG)**. 2000. 43 f. Monografia (Graduação em ciências biológicas) – Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, MG.

HILLYARD, C. J., RYLATT, D.B., BUNDESEN, P., G. e KEMP, B. E. Disease diagnosis in two minutes. **Diagnostic alert**, 1996.

HUDSON, L. e HAY, F. C. **Imunología práctica**. Barcelona: Editorial JIMS, 1979. 326 p.

KLIKS, S; NIMMANITYA, S.; NISALA, A. e BURKE, D. S. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 38, n. 2, p. 411-419, 1988.

KOURI, G.; GUZMÁN, M. G. e BRAVO, J. Why dengue hemorrhagic fever in Canada? II An integral analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, p. 821-823, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LENNETE, E. H. **Laboratory diagnosis of viral infections**. 2 ed. Nova York: Marcel Dekker, 1992. 783 p.

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

LIOTTA, D. J.; CABANNE, S.; CAMPOS, R. e TONON, S. A. Detection of dengue viruses type 1 and 2 in mosquitoes *Aedes aegypti* by RT-PCR, enzyme restriction assay and cycle sequencing: a practical approach. In: XI Encontro Nacional de Virologia/ 3º Encontro de Virologia do MERCOSUL, 2000, São Lourenço, MG. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: C.C.R. Empresa Jornalística Ltda, 2000. 210 p. v. 5, n. 2. p 81.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MEDIVAX. **IndexÒ dip-s-ticks para detecção de doenças causadas por artrópodes Dengue**. Rio de Janeiro: Medivax, Indústria e comércio Ltda, 2000. 15 p.

MIAGOSTOVICH, M. P.; DE SIMONE, T. S.; ARAÚJO, E. S. M.; MIRANDA, L. H. A.; SCHATZMAYR, H. G. e NOGUEIRA, R. M. R. The evaluation of IgM anti-dengue immune response in sequential infection. **Virus Review and Research**, v. 6, n. 2, p. 13-19, 2001.

MIAGOSTOVICH, M. P.; SANTOS, F. B.; GUTIÉRREZ, C. M.; RILEY, L. W. e HARRIS, E. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1286-1289, 2000.

MICHIGAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION. **Michigan Mosquito Manual**. EUA, 2002. 109 p.

MONATH, T. P.; WANDS, J. R., HILL, L. J., GENTRY, M. K. e GUBLER, D. J. Multisite monoclonal immunoassay for dengue viruses: detection of viremic human sera and interference by heterologous antibody. **Archives of Virology**, v. 67, p. 639-650, 1986.

MURPHY, F. A. New, emerging, and reemerging infectious diseases. **Advances in Virus Research**, v. 43, p. 1-52, 1988.

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

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

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P. e SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 1, 2000.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S. e SCHATZMAYR, H. G. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. 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. e 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, 1995.

O'SULLIVAN, M. J. e MARKS, V. Methods for the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme immunoassay. In: **Methods in Enzimology**. EUA: Academic Press, 1981. v. 73., cap. 9. 147-157.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods Enzymol**, v. 91, p. 95-119, 1983.

PINHEIRO, F. P. e CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World Health Statist. Quart.**, v. 50, n. 3-4, p. 161-169, 1997.

PINHEIRO, F. P. e DA ROSA, A. P. A. Arboviroses. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap 19, p. 156-165.

PRIBIL, P.; SQUIRES, B. e ZIONS, D. **Dengue viruses**. Disponível em: <<http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology/21/DENGUE.HTM>>. Acesso em: 24/07/2001.

RAMOS, C.; GARCIA, H. e VILLASECA, J. M. Fiebre hemorragica y sindrome de choque por dengue. **Salud Publica de Mexico**, v. 35, n. 1, 1993.

REED, L. J. e MUENCH, H.P. A simple method of estimating fifth percent end points. **American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; ANDERSON, R. A. e CLARK, G. G. Short Report: Dispersal of *Aedes Aegypti* in an Urban Area After Blood Feeding as Demonstrated by Rubidium-Marked Eggs. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 52, n. 2, p. 177-179, 1995.

RICE, C. M.; STRAUSS, E. G. e STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. In: **The Togaviridae and flaviviridae**. New York: Plenum, 1986. p. 279-327.

RICHMAN, D. D.; CLEVELAND, P. H.; OXMAN, M. N. e JOHNSON, K. M. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. **J. Immunol.**, v. 128, p. 2300-2305, 1982.

ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 26, n. 3, p. 337-343, 1977.

ROSEN, L. e GUBLER, D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 6, p. 1153-1160, 1974.

ROTHMAN, A. L. e ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, p. 1-6, 1999.

SANTOS, C. N. D. Dengue recombinant antigens: perspectives for their use in diagnosis and chemotherapy of dengue fever. In: XII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: Imprinta Express, 2002.190 p. v. 7, n. 1. p 30.

SMITH, D. S. e UTSUMI, S. Structure at the hinge region in rabbit immunoglobulin-G. **Nature**, v. 216, p. 332-335, 1967.

SOUZA, L. T. M.; FERREIRA, I. B.; ROCCO, I. M.; KATZ, G.;NAGAMORI, A. H.; SOUZA, D. M.; COIMBRA, T. L. M.; PETRELLA, S. M. C. N.; SPINDOLA, R. M.; FIALHO, D. M. e SUZUKI, A. Dengue: epidemiological and laboratorial aspects, São Paulo state, Brazil, 2002. In: XII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: Imprinta Express, 2002.190 p. v. 7, n. 1. p 96.

TALARMIN, A.; LABEAU, B.; LALARGE, J. e 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.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. e GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

THONGCHAROEN, P.; WASI, C. e PUTHAVATHANA, P. Dengue viruses monograph on dengue/ dengue hemorrhagic fever. **World Health Organization**. New Delhi : Prasert Thongcharoen, 1993.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária uma introdução**. 5 ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

TORRANCE, L. Immunological detection and quantification methods. In: OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water, 1998. **Interlaken**, 1998. p. 1-10.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; ARAÚJO, G. C. B.; VASCONCELOS, H. B.; CARVALHO, C. L.; AZEVEDO, R. S. S.; SOUZA, M. R. S. e VASCONCELOS, P. F. C. Vigilance of dengue serotypes circulation in the brazilian Amazon region in the period of january 2001 and may 2002. In: XII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. São Paulo: Imprinta Express, 2002. 190 p. v. 7, n. 1. p 101.

VIZCARRAPHARMA. **Test kit for the detection of antibody to hepatitis B virus (anti-HBs) [Passive Hemagglutination Assay Method]**. Disponível em: <<http://www.vizcarrapharma.com/index.products.html>>. Acesso em: 30/01/2003.

VORDAM, V. e KUNO, G. **Laboratory diagnosis of dengue vírus infections.** United Kingdon, p. 313-334, 1997.

WATTS, D. M.; PORTER, K. R.; PUTYATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C. G.; HALSTEAD, S. B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 354, n. 9188, p. 1431-1434, 1999.

WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D. H. e BIRLEY, M. H. Deforestation: effects on vector-borne disease. **Parasitology**, v. 106, p. S55-S75, 1993.

WEILAND, F.; WEILAND, E.; UNGER, G.; SAALMULLER, A. e THIEL, H.J. Localization of pestiviral envelope proteins E^{ms} and E2 at the cell surface and on isolated particles. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1157-1165, 1999.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue haemorrhagic fever in World Health Organization on global surveillance of epidemic-prone infectious disease.** Disponível em: <<http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr2001.html/dengue/dengue.htm>>. Acesso em: 04/04/2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for treatment of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in small hospitals.** New Delhi, 1999. 29 p.

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