

MARCELO SANTOS DE OLIVEIRA

**ENAGIS-MAY: UMA PROPOSTA DE ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO
INDIRETA PARA DETECTAR NO SANGUE IMUNOGLOBULINAS
CONTRA O VÍRUS MAYARO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de
Magister Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

MARCELO SANTOS DE OLIVEIRA

**ENAGIS-MAY: UMA PROPOSTA DE ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO
INDIRETA PARA DETECTAR NO SANGUE IMUNOGLOBULINAS
CONTRA O VÍRUS MAYARO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2008.

**Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Co-Orientador)**

**Prof. Murilo Geraldo de Carvalho
(Co-Orientador)**

Prof. Francisco Murilo Zerbini Jr.

Prof. Murilo Gomes Oliveira

**Prof. Jose Mario da Silveira Mezencio
(Orientador)**

À minha esposa Ana Paula Totosa
Aos meus pais Genézio e Maria Antônia
Aos meus irmãos Elaine e Rogério
À minha família Brasil...

*“A descoberta consiste em ver o que todos viram
e em pensar no que ninguém pensou.” (Albert Szent-Györgyi)*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente e me iluminar durante todo o percurso.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de cursar o mestrado em Biologia Celular e Estrutural.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Jose Mario da Silveira Mezencio pela orientação na realização deste trabalho, pelos conselhos, pelas palavras amigas e pela atenção que dedicara a mim. Além da orientação, ganhei também um amigo.

Ao Professor Sérgio Oliveira de Paula pela colaboração e sugestões no trabalho, e pelos ensinamentos em biologia molecular.

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini Jr. pelas orientações e pela ajuda, sempre muito bem-vinda.

Ao Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular do DBG por ter fornecido os conhecimentos e equipamentos para execução dos trabalhos.

Ao Laboratório de Virologia Molecular de Plantas do BIOAGRO, pelos equipamentos utilizados que foram muito úteis durante os experimentos.

À minha esposa Ana Paula Rodrigues Brasil pela ajuda sentimental, profissional, pessoal e sem dúvida, essencial durante todo o curso, e a quem eu devo muitos agradecimentos e que sempre amarei por toda a minha vida. Foi sempre um exemplo de amor e dedicação aos estudos, e de grande competência profissional.

À família Rocha (Camila e Carol) pela amizade, pelos banquetes, pelas festas, e por terem se tornado minhas grandes amigas durante minha vida viçosense.

À amiga Aline Torres Chagas pela ajuda sempre providencial, pela amizade e pelo carinho.

À companheira Ana Carolina Dias Fialho pela ajuda e pelos ensinamentos em biologia molecular.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório: Reggiane, Mariáurea, Fred, Karine, Ângelo, Nina, Kelly, Marília, Michelle, Rui, Camila Pinheiro, Tácio, Vivian, Germano e Alípio. Também aos amigos Cirlei, Marcília, Fabiano e Tatiana.

Aos funcionários Chiquinho, Jorge e João, pela atenção, pelo companheirismo e por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos funcionários e ex-funcionários da Secretaria do DBG, Rose, Beth, Diana e Salvadora, pela ajuda e colaboração nos assuntos administrativos.

Aos meus pais Genézio e Maria Antônia, pelo amor, pela torcida e pelas orações. Mesmo à distância, recebi muito carinho e amor. Sempre lhes serei grato por tudo que fizeram por mim, pela educação e pela confiança depositadas. Amo muito vocês...

Aos meus irmãos Elaine e Rogério, e aos irmãos BRASiLeiros, Aline e Juninho, pelo carinho e amizade. Agradeço também a Paulo Rubens e Dirma, que sempre me motivaram e apoiaram. Vocês são muito mais do que sogros...

BIOGRAFIA

Marcelo Santos de Oliveira, filho de Genézio Paulo de Oliveira e Maria Antônia Santos de Oliveira, nasceu em Santos Dumont, Minas Gerais, em 25 de julho de 1979.

Em setembro de 2003, graduou-se em Farmácia e Bioquímica, pela Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

No período de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2006, cursou especialização na modalidade de residência em Análises Clínicas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

No período de agosto de 2004 a agosto de 2005, cursou especialização *Latu sensu*, em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em março de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obtenção do título de *Magister Scientiae*, no dia 26 de fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Arbovírus	3
2.1.1. <i>Mayaro virus</i>	7
2.1.1.1. Propriedades gerais	9
2.1.1.2. Estrutura do genoma	10
2.1.1.3. Proteínas estruturais	11
2.1.1.4. Proteínas não-estruturais	12
2.1.1.5. Replicação viral	13
2.1.1.6. Patogênese da febre Mayaro	15
2.1.1.7. Diagnóstico da febre Mayaro	16
2.2. Reações de aglutinação no diagnóstico laboratorial	18
2.2.1. Aglutinação indireta em amostras de sangue total	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Cultura de células	21
3.2. Multiplicação do <i>Mayaro virus</i> e preparo do estoque viral padrão .	21
3.3. Titulação do estoque viral padrão	22
3.4. Multiplicação do MAYV para obtenção de proteínas virais	22
3.5. Concentração das partículas virais	23
3.6. Identificação das proteínas do MAYV	23
3.7. Dosagem das proteínas virais	24
3.8. Obtenção de anticorpos contra MAYV	24
3.9. Acoplamento das partículas do látex com proteínas do MAYV(LPCM-MAY)	24

3.10. Preparo de amostra de sangue humano contendo anticorpos antimayaro	25
3.11. Estabelecimento do protocolo para realização do ENAGIS-MAY .	26
3.11.1. ENAGIS-MAY em amostras de sangue humano	26
3.11.2. ENAGIS-MAY em amostras de sangue humano impregnadas em papel de filtro	26
3.12. Determinação da sensibilidade e especificidade do ENAGIS- MAY	27
3.12.1. Ensaio Biológico	27
3.12.2. Ensaio de neutralização de placa em microcultura das amostras de soro obtidas no ensaio biológico (ENPM)	28
3.12.3. Pesquisa de anticorpos contra albumina sérica bovina (LPCM- BSA)	29
3.13. Análise estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Infecção de células VERO pelo <i>Mayaro vírus</i> e observação do efeito citopático	30
4.2. Titulação do estoque viral padrão	31
4.3. Identificação das proteínas do MAYV	31
4.4. Dosagem das proteínas virais	35
4.5. Avaliação do ENAGIS-MAY	36
4.6. Avaliação do ENAGIS-MAY em amostras de sangue humano impregnadas em papel de filtro	41
4.7. ENAGIS-MAY das amostras de sangue dos animais do ensaio biológico	43
4.8. Ensaio de neutralização de placa em microcultura das amostras de soro obtidas no ensaio biológico	46
4.9. Determinação da sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY	48
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS	53
7. APÊNDICE	61
APÊNDICE 1	61
APÊNDICE 2	62

APÊNDICE 3	62
APÊNDICE 4	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	Albumina sérica bovina
BHK-21	Células de rim de hamster neonato
DFV	<i>Dengue fever virus</i>
CED ₅₀	Título de anticorpos capaz de promover a redução de 50% das placas de lise
ECP	Efeito citopático
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida HCl
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENAGIS-MAY	Ensaio de aglutinação indireta para a detecção de imunoglobulinas contra o vírus Mayaro a partir do sangue total
ENPM	Ensaio de Neutralização de Placa em Microcultura
FC	Fixação do complemento
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IF	Imunofluorescência
IFN- α	Interferon alfa
IH	Inibição da hemaglutinação
L-15-C	Meio L-15 suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino)
L-15-MAN	Meio L-15 suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de anfotericina B e 1% de soro fetal bovino)
L-15-SS	Meio L-15 contendo ágar 0,9%, 500 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino
LPCM-BSA	Látex de poliestireno carboxil-modificado contendo albumina sérica bovina
LPCM-MAY	Látex de poliestireno carboxil-modificado contendo proteínas do Mayaro.
MOI	Multiplicidade de infecção
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM
MAYV	<i>Mayaro virus</i>
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
MIAF	Líquido ascítico hiperimune de camundongo
ORF	<i>Open reading frame</i>
OROV	<i>Oropouche virus</i>
p.i.	Pós infecção
PB	Tampão de fosfatos

PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PFU	Unidades formadoras de placa
SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
SINV	<i>Sindbis virus</i>
SN	Soroneutralização
VEEV	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>
VERO	Células da cápsula renal de macacos Rhesus
WEEV	<i>Western equine encephalitis virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>

RESUMO

OLIVEIRA, Marcelo Santos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **ENAGIS-MAY: uma proposta de ensaio de aglutinação indireta para detectar no sangue imunoglobulinas contra o vírus Mayaro.** Orientador: Jose Mario da Silveira Mezencio. Co-orientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Murilo Geraldo de Carvalho.

O vírus Mayaro (MAYV) foi isolado inicialmente em Trinidad em 1954. No Brasil foi isolado em 1955 durante surto ocorrido no estado do Pará. Surtos têm sido descritos nas regiões da floresta amazônica, no norte do Brasil, onde pode ser considerado endêmico, e cujo ecossistema tem sido profundamente perturbado. Os sintomas causados pela infecção do MAYV são semelhantes aos causados por várias arboviroses, entre elas a dengue. O objetivo deste trabalho foi a padronização de um ensaio de aglutinação indireta para a detecção de imunoglobulinas contra o vírus Mayaro a partir do sangue total (ENAGIS-MAY). Células VERO foram infectadas com MAYV (MOI 1) para a obtenção das proteínas virais, as quais foram acopladas covalentemente a microesferas de poliestireno carboxil-modificadas. Para o ensaio biológico foram utilizados oito camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, divididos em dois grupos. O grupo M foi infectado com MAYV e o grupo C foi inoculado com PBS pH 7,2. Após 30 dias, amostras de sangue foram coletadas e analisadas para a presença de anticorpos antimayaro. Cerca de 50µL de sangue de cada animal foram aplicados em discos de papel de filtro, e após secagem, eluídos com tampão borato 0,2M pH 8,5. O ENAGIS-MAY foi realizado com 10µL do eluído e 10 µL do látex contendo proteínas virais, e após 5 min de incubação, a presença de aglutinação foi observada. As amostras do grupo M apresentaram títulos de 50, 100, 50 e 50 para M1, M2, M3 e M4, respectivamente. Todas as amostras do grupo C foram negativas. Títulos de anticorpos neutralizantes foram determinados para os dois grupos pelo

ensaio de neutralização de placa em microcultura e utilizados como padrão para cálculo da sensibilidade (100%; I.C. 95%: 39,8-100,0) e especificidade (100%; I.C. 95%: 39,8-100,0) do ENAGIS-MAY. A análise pelo teste de Fisher indicou que os resultados entre os ensaios apresentam correlação significativa ($p < 0,05$). Portanto é possível a utilização do ENAGIS-MAY para a detecção de anticorpos antimayaro a partir de amostras de sangue impregnadas em papel de filtro.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Marcelo Santos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008. **ENAGIS-MAY: an indirect agglutination assay to detect immunoglobulins against the *Mayaro virus* in whole blood.** Adviser: Jose Mario da Silveira Mezencio. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Murilo Geraldo de Carvalho.

Mayaro virus (MAYV) was initially isolated in Trinidad in 1954. In Brazil was isolated in 1955 during an outbreak in the state of Pará. Various outbreaks have been described in areas of the Amazon forest, in the north of Brazil, where it can be considered endemic, and whose ecosystem has been deeply disturbed. The symptoms caused by MAYV infection are similar to the caused by several arboviral diseases, include dengue. The objective of this work was the establishment of an indirect agglutination assay for the detection of immunoglobulins against *Mayaro virus* using whole blood (ENAGIS-MAY). VERO cells were infected with MAYV (MOI 1) to obtaining antigens, which were covalently coupled to carboxyl-modified polystyrene beads. For the biological assays eight *Mus musculus*, Swiss lineage mice were used, divided in to two groups. Group M was infected with MAYV and group C received PBS pH 7,2. After 30 days, blood samples were collected and analyzed for the presence of antimayaro antibodies. About 50 µL of blood from each animal were applied to filter paper disks and, after drying, eluated with 0,2M borate buffer pH 8,5. ENAGIS-MAY was assayed with 10µL of eluate and 10µL of suspension of latex beads containing virus proteins. After 5 min incubation, the occurrence of agglutination was observed. Samples in group M presented titers of 50, 100, 50 and 50 for M1, M2, M3 and M4, respectively, while all samples in group C were negative. Titers of neutralizing antibodies were determined for the two groups by the microculture plaque neutralization test and used as gold standard to calculate the sensibility (100%; 95% C.I.: 39,8-100,0) and specificity (100%; 95% C.I.:

39,8-100,0) of ENAGIS-MAY. Analysis by the Fisher test indicated that the assays results were significantly correlated ($p < 0,05$). Therefore ENAGIS-MAY is likely to be feasible for routine diagnoses of the *Mayaro* fever using blood-impregnated filter paper.

1. INTRODUÇÃO

O vírus Mayaro (MAYV) foi isolado inicialmente em trabalhadores rurais febris em Trinidad em 1954. No Brasil foi isolado em 1955 durante um surto ocorrido em uma comunidade rural a 190 Km a leste de Belém no Pará.

Embora apresente baixas taxas de mortalidade, a febre Mayaro, juntamente com a febre amarela, é uma das principais arboviroses para a saúde pública entre populações rurais que vivem no norte na América do Sul e na bacia amazônica. Surto têm sido descritos no norte do Brasil, onde pode ser considerada endêmica.

O vírus Mayaro pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alfavirus*, apresentando vírions com 70 nm de diâmetro e nucleocapsídeo icosaédrico, circundado por um envelope lipídico derivado de vesículas e da membrana plasmática do hospedeiro. O genoma é constituído de fita simples de RNA não-segmentado e de polaridade positiva.

A manutenção do ciclo do MAYV é semelhante ao ciclo da febre amarela silvestre e envolve primatas, que vivem nas regiões de floresta, como reservatórios, e um mosquito - *Haemagogus janthinomys* - como vetor. Este é um hematófago de hábitos diurnos que vive nas regiões neotropicais das florestas, sendo também o vetor da febre amarela silvestre. Pássaros também podem estar envolvidos na manutenção do ciclo do MAYV. A maioria dos casos de infecções em humanos ocorre de modo esporádico, sendo propiciada pela presença do indivíduo no habitat dos animais reservatórios e do vetor.

Os sintomas causados pela infecção do MAYV são semelhantes aos sintomas causados por várias arboviroses, entre elas a dengue. As manifestações clínicas mais frequentes consistem em febre, artralgia e exantema, que duram de 3 a 5 dias.

Apesar da mortalidade baixa devido à infecção pelo MAYV, a doença pode causar morbidade significativa entre pessoas que vivem em áreas rurais. Artralgias intensas causam incapacitação temporária para o trabalho e em alguns casos os pacientes necessitam de internação hospitalar. Consequentemente, uma epidemia pode ter impacto social e econômico no país.

Embora o diagnóstico clínico seja difícil devido ao polimorfismo clínico existente entre várias arboviroses, o agente causador da doença deve ser diagnosticado rapidamente, pois algumas arboviroses podem evoluir para quadros clínicos graves, como em alguns casos de dengue hemorrágica, de hepatite viral causada pela febre amarela ou artralgias crônicas na febre Mayaro. O diagnóstico rápido e preciso é necessário para a elaboração de medidas de controle e prevenção de surtos da doença.

Os principais pontos a serem considerados em se tratando de técnicas de diagnóstico são a sensibilidade e especificidade do teste. A técnica de aglutinação indireta a partir do sangue total atende a essas necessidades, por se tratar de uma técnica capaz de amplificar a resposta através da aglutinação, apresentando boa sensibilidade. A especificidade é alcançada com a utilização de proteínas específicas do vírus. Além disso, esse ensaio não necessita de equipamentos sofisticados, é de fácil execução, podendo ser realizado no campo. É também muito seguro, pois não necessita de várias manipulações da amostra biológica, e apresenta um custo final atrativo aos serviços públicos de saúde em virtude da simplicidade dos reagentes.

O objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio de aglutinação indireta a fim de detectar imunoglobulinas contra o vírus Mayaro no sangue total (ENAGIS-MAY).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Arbovírus

Arbovírus são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo vírus mantidos na natureza principalmente, ou em grande parte, através da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis por artrópodes hematófagos. Estes vírus multiplicam-se e produzem viremia em vertebrados. Multiplicam-se em tecidos dos artrópodes, sendo transmitidos para novos vertebrados através da picada após um período de incubação extrínseco (PORTERFIELD, 1986).

A habilidade de se multiplicar tanto em células de vertebrados quanto de invertebrados é única para os arbovírus. Multiplicam-se nos vetores artrópodes sem causar-lhes danos consideráveis. Os vetores mais comuns são carrapatos da ordem *Acarienses*, mosquitos e flebótomos da ordem dos insetos dípteros e culicídeos da família *Ceratopogonidae*. Alguns artrópodes transmitem o vírus à progênie pela via transovariana (CHIPPAUX, 2003). Arboviroses são, com poucas exceções, zoonoses que dependem de outras espécies animais, que não o homem, para sua manutenção em natureza (KARABATSOS, 1985). Os reservatórios mais importantes para as arboviroses são os pássaros e os roedores (GUBLER, 2002). Em geral grandes mamíferos como o homem são considerados como hospedeiros finais, uma vez que a infecção causada pelos arbovírus neles produz graves conseqüências, podendo levar à morte (WEAVER e BARRETT, 2004).

Entre os arbovírus apenas 40% são transmitidos diretamente pela picada do vetor artrópode. Os demais são transmitidos por formas iatrogênicas (transusão sangüínea), ingestão de alimentos contaminados, contato direto com órgãos ou secreções de animais infectados. No entanto,

todas estas formas indiretas de transmissão não excluem a participação prévia do vetor artrópode (CHIPPAUX, 2003).

Em junho de 2000, o catálogo do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) sobre arbovírus reportou 534 espécies de arbovírus pertencentes a 8 famílias e 14 gêneros diferentes. Destes, 150 são de importância para a medicina humana ou veterinária (KARABATSOS, 2002). No Brasil, mais de 200 espécies de arbovírus já foram identificadas, dentre as quais 40 causando doenças em humanos (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998b).

Os arbovírus estão distribuídos globalmente, principalmente nas áreas tropicais, onde o clima quente favorece a transmissão e manutenção do ciclo de vida dos vetores artrópodes (pecilotermos) durante o ano todo (GUBLER, 1996; KARABATSOS, 1985). Algumas espécies de arbovírus têm distribuição geográfica localizada devido às condições que limitam a distribuição dos vetores e dos hospedeiros tais como temperatura, quantidade de chuvas, umidade e tipo de vegetação (GUBLER, 2002).

Nos últimos 20 anos as epidemias globais de arbovírus têm aumentado drasticamente, em razão de a distribuição geográfica de alguns vetores e também de alguns vírus ter-se expandido, acompanhando grandes e freqüentes epidemias, como por exemplo a dengue. Muitos arbovírus têm grande potencial para causar epidemias e se espalhar geograficamente, entre eles o MAYV (GUBLER, 2002). Na Figura 1 encontram-se os locais das principais epidemias de arbovírus na última década registradas.



Figura 1 – Principais epidemias causadas por arbovírus entre 1990-2000 (Adaptado de GUBLER, 2002).

A emergência e reemergência de arbovírus são fenômenos naturais que variam de acordo com a evolução e adaptação da espécie artrópode e do próprio vírus. Mudanças ambientais provocadas pelo homem, como por exemplo, urbanização descontrolada, desmatamento, construção de represas, baixas condições de saneamento básico das populações (GUBLER, 1996; GUBLER, 1998) podem criar novos reservatórios e induzir arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Além disso, alguns arbovírus podem ser levados a locais distantes em pássaros reservatórios, chegando a novos países e continentes, constituindo-se assim em um risco potencial para causar pandemias (FIGUEIREDO, 2007).

A maioria das infecções por arbovírus apresenta-se sob diferentes formas clínicas. Além disso, vírus de diferentes famílias e sorotipos podem causar patologias com quadros clínicos semelhantes e em grande número dos casos a infecção pode ser assintomática. Isso contribui para a grande dificuldade em se estabelecer o diagnóstico presuntivo baseado apenas nos sinais clínicos (DELMONT, 2003).

O diagnóstico das arboviroses é feito principalmente com o isolamento viral em culturas de células de mamíferos, mosquitos ou carrapatos. Métodos para a detecção do genoma viral no soro, líquido cefalorraquidiano ou nos tecidos do hospedeiro baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) têm sido utilizados, além de testes sorológicos, tais como a fixação do complemento (FC), soroneutralização (SN), inibição da hemaglutinação (IH) e testes imunoenzimáticos (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Testes com sorologia pareada (duas coletas de sangue do paciente com intervalo de 15 dias) têm sido utilizados para confirmação da doença (DELMONT, 2003; CHIPPAUX, 2003).

Embora o diagnóstico clínico seja difícil devido ao polimorfismo clínico e não exista tratamento específico para cada arbovirose, o agente causador da doença deve ser diagnosticado rapidamente, pois algumas arboviroses podem evoluir para quadros clínicos graves. Além disso, a identificação do agente etiológico permite a adoção de medidas de controle dos vetores com intuito de diminuir o risco de epidemias (DELMONT, 2003).

No Brasil, o risco de epidemias por arbovírus está relacionado a que mais de um terço do território brasileiro ser coberto por florestas tropicais ou outros ecossistemas. Além do mais, a existência de grandes cidades densamente povoadas e infestadas de mosquitos, algumas em regiões muito próximas a esses ecossistemas, aumenta a possibilidade de ocorrência de surtos de arbovírus (FIGUEIREDO, 2007).

Embora a dengue, causada pelo *Dengue fever vírus* (DFV, gênero *Flavivírus*, família *Flaviviridae*) seja a arbovirose mais importante no Brasil, existem outras três que também são importantes para saúde pública: a febre amarela causada pelo *Yellow fever virus* (YFV – gênero *Flavivírus*, família *Flaviviridae*); febre Oropouche causada pelo *Oropouche virus* (OROV – gênero *Bunyavirus*, família *Bunyaviridae*) e febre Mayaro causada pelo *Mayaro virus* (MAYV – gênero *Alfavirus*, família *Togaviridae*) (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

O vírus Mayaro tem sido foco de estudos, uma vez que a proximidade das populações humanas das regiões onde existe o MAYV tem sido cada vez maior, aumentando assim o risco de epidemias (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

2.1.1. *Mayaro virus*

O *Mayaro virus* foi isolado inicialmente no sangue de cinco trabalhadores rurais febris em Trinidad em 1954 (ANDERSON *et al.*, 1957). No Brasil, foi pela primeira vez isolado em 1955 durante um surto em uma comunidade rural a 190 Km a leste de Belém, no Pará (AIKEN *et al.*, 1960).

Embora a febre Mayaro apresente baixa taxa de mortalidade, junto com a febre amarela, ela é uma das principais arboviroses de importância para a saúde pública entre populações rurais que vivem ao norte na América do Sul e na região da bacia amazônica (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Surtos têm sido descritos nas regiões da floresta amazônica, onde pode ser considerada endêmica (PINHEIRO *et al.*, 1981; TESH *et al.*, 1999), e cujo ecossistema tenha sido profundamente perturbado (VASCONCELOS *et al.*, 2001). De 1955 a 1991 ocorreram seis surtos da doença no Brasil. O primeiro surto ocorreu em 1955 em uma comunidade de trabalhadores de uma pedreira, próximo do rio Guamá, no Pará, quando 50 pessoas foram infectadas. Em 1978 ocorreu o segundo surto da doença, no distrito de Belterra, Santarém-PA, quando 800 pessoas foram infectadas, tendo sido possível isolar o MAYV a partir do mosquito da espécie *Haemagogus janthinomys* (HOCH *et al.*, 1981; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1989; PINHEIRO e LeDUC, 1998), um hematófago de hábitos diurnos que vive nas regiões neotropicais das florestas primitivas (HOCH *et al.*, 1981). Durante este surto também foi descoberta a presença de anticorpos contra vírus em 1% dos pássaros e 27% de macacos do gênero *Callithrix*, indicando serem estes o hospedeiro vertebrado do vírus. Em 1981 ocorreu o terceiro surto, em Conceição do Araguaia, sudeste do Pará. O primeiro surto fora do Pará foi registrado em 1987, em Itarumã – GO. Em 1991 dois outros surtos ocorreram em duas cidades diferentes do Brasil, em Benevides – PA e em Peixe – TO (VASCONCELOS *et al.*, 1998; 2001). Anticorpos contra MAYV já foram encontrados também em um estudo sobre a população indígena Xavante, no estado de Mato Grosso (NEEL *et al.*, 1968) e em três indivíduos que foram a Camapuã-MS (COIMBRA *et al.*, 2007), indicando que a doença pode ser encontrada em áreas próximas à bacia Amazônica.

A manutenção do ciclo do MAYV é semelhante ao da febre amarela silvestre e envolve primatas que vivem nas regiões de floresta. A maioria dos casos de infecções em humanos ocorre de modo esporádico e resulta de uma exposição continuada com o habitat dos animais reservatórios (LAVERGNE *et al.*, 2006). No entanto, em um estudo soroepidemiológico, De Thoisy *et al.* (2003) constataram a prevalência do MAYV entre diversas espécies de mamíferos habitantes da floresta amazônica (tamanduás, preguiças, cutias, marsupiais, roedores, carnívoros e primatas); alertaram para o risco de novos surtos epidêmicos, pois o vetor pode voar até áreas distantes, e espécies periurbanas também poderiam atuar como reservatórios. Além disso, surtos entre populações humanas podem ocorrer quando pássaros ou vetores introduzem o vírus em áreas rurais com grande densidade de *Haemagogus* e reservatórios potenciais (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Segundo Powers *et al.* (2006), a manutenção do padrão genético entre os isolados do MAYV indica que este pode apresentar um ciclo envolvendo pássaros, pois isolados de áreas e épocas diferentes apresentaram padrões semelhantes de homologia. Alguns isolados já foram obtidos de pássaros (CALISHER *et al.*, 1974).

Admite-se ser possível que MAYV ser transmitido por outros gêneros de mosquitos, tais como *Culex*, *Aedes*, *Psophora* e *Sabethes*, e poder ocorrer uma forma urbana da doença, assim como se verifica com a febre amarela (SMITH e FRANCY, 1991; NAVARRETE-ESPINOSA e GÓMEZ-DANTÉS, 2006). Além disso, já foi descrita epidemia simultânea das febres amarela e Mayaro (PINHEIRO *et al.*, 1978) em Belterra-PA, até por que o ciclo de manutenção de ambas é semelhante, envolvendo o macaco e o *Haemagogus*. Outro grave problema seria a associação da febre Mayaro com a dengue (TESH *et al.*, 1999; COIMBRA *et al.*, 2007). Estudos experimentais já demonstraram a capacidade de o *Aedes aegypti* ser infectado e poder transmitir o vírus Mayaro (ANDERSON *et al.*, 1957).

O MAYV já foi isolado na Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Brasil, Peru, Bolívia, Costa Rica, Panamá, Trinidad e Tobago, México e Estados Unidos (METSELAAR, 1966; CALISHER *et al.*, 1974; PINHEIRO e LeDUC, 1998; TALARMIN *et al.*, 1998; JUNT *et al.*, 1999;

TESH *et al.*, 1999; WATTS, 2000; TORRES *et al.*, 2004; NAVARRETE-ESPINOSA e GÓMEZ-DANTÉS, 2006) (Figura 2).



Figura 2 – Países onde o MAYV já foi isolado (adaptado de NAVARRETE-ESPINOSA e GÓMEZ-DANTÉS, 2006).

2.1.1.1. Propriedades gerais

O MAYV pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alfavirus* (FAUQUET *et al.*, 2005). *Alfavirus* reúne 30 espécies classificadas de acordo com seus determinantes antigênicos e as diferenças genômicas. Todos são transmitidos por artrópodes, daí serem considerados arbovírus (CALISHER *et al.*, 1980; STRAUSS e STRAUSS, 1994; VAN REGENMORTEL, 2000; SCHLESINGER e SCHLESINGER, 2001). Os principais representantes

deste gênero são os *Sindbis virus* (SINV) e o *Semliki forest virus* (SFV) (SCHLESINGER e SCHLESINGER, 2001). Os alfavírus apresentam vírions com 70 nm de diâmetro e nucleocapsídeo icosaédrico formado por 240 unidades da proteína do capsídeo ou proteína C, circundado por um envelope lipídico derivado da membrana plasmática do hospedeiro. O genoma dos alfavírus é constituído por uma fita simples de RNA não-segmentado de polaridade positiva, sendo ligado ao lado interno do capsídeo pela proteína C (STRAUSS e STRAUSS, 1994; SCHLESINGER e SCHLESINGER, 2001).

2.1.1.2. Estrutura do genoma

Junt *et al.* (1999) sequenciaram um isolado do MAYV na Guiana Francesa, cujo genoma apresentou 11.429 nucleotídeos (exceto a cauda poliadenilada – poli-A), com 27,4% de adenina, 25,7% de citosina, 25,7% de guanina e 21,2% de timina (uracila). A primeira ORF (*Open reading frame*) possui um códon de iniciação nos nts. 77-79 e de terminação entre 7.384-7386, capaz codificar uma poliproteína com 2.453 aminoácidos, que durante a tradução, sofre clivagens mediadas por nsP2, originando as proteínas não-estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. Dentro dessa ORF há também um códon de parada na extremidade C-terminal de nsP3, o que ocasiona a tradução de uma poliproteína cuja clivagem origina as proteínas nsP1-3. A segunda ORF é traduzida apenas no RNA subgenômico 26S, e origina as proteínas estruturais. O RNA subgenômico 26S possui 3.756 nucleotídeos (exceto a cauda poli-A) e uma região 5' não-codificante com 28 nucleotídeos que constitui o promotor 26S. A poliproteína seria composta de 1.252 aminoácidos.

A análise parcial da sequência de nucleotídeos que codifica as proteínas nsP1 (proteína não-estrutural 1) e da região não-codificante próxima à extremidade 3' do RNA genômico 42S indicou que o MAYV pertence ao complexo SFV, o qual inclui vários vírus do velho e do novo mundo (STRAUSS e STRAUSS, 1994; VAN REGENMORTEL, 2000;

POWERS *et al.*, 2001). Estudos sobre a filogenia do MAYV indicam que este é relacionado ao SFV, apresentando 81,2% de identidade para a proteína não-estrutural nsP1 e 73,1% de identidade para a proteína estrutural E1 (LAVERGNE *et al.*, 2006).

Em seu estudo, Powers *et al.* (2006) avaliaram 63 isolados do MAYV através de análises filogenéticas e identificaram dois genótipos distintos do vírus com localizações geográficas diferentes. O genótipo D foi isolado em Trinidad e Tobago e na porção centro-norte da América do Sul (Peru, Guiana Francesa, Suriname, Brasil e Bolívia). O genótipo L foi encontrado apenas no Brasil, e apresentou uma diferença de 15-19% em relação ao genótipo D. Como houve uma baixa diversidade genética entre os isolados dentro de cada genótipo, acredita-se que ambos sejam mantidos por ciclos enzoóticos independentes. O genótipo L poderia ser transmitido por vertebrados residentes em nichos específicos mais do que por pássaros, enquanto que o genótipo D seria transmitido para áreas diferentes através de pássaros agindo como reservatórios.

2.1.1.3. Proteínas estruturais

O vírus Mayaro consiste de partículas envelopadas com $69 \pm 2,3$ nm de diâmetro (MEZENCIO e REBELLO, 1993). Três proteínas estruturais foram identificadas: p1 (54 kDa), p2 (50 kDa) e p3 (34 kDa). As proteínas p1 e p3 são as mais abundantes, presentes em quantidades equimolares, enquanto a proteína p2 apresenta-se em menor quantidade. Fazendo-se uma analogia com os outros alfavírus, as proteínas p1 e p2 seriam equivalentes às glicoproteínas E1 e E2, respectivamente. Já a proteína p3 seria a proteína do capsídeo (proteína C). Assim como o SINV, o MAYV também não apresenta as proteínas E3 e 6 kDa (MEZENCIO e REBELLO, 1993).

Acredita-se que as proteínas p1 e p2 formem um dímero e se projetem do envelope lipoprotéico formando espículas, como as proteínas E1 e E2 nos demais alfavírus. Nestes, a proteína E2 está envolvida no

reconhecimento celular e na adsorção viral e a proteína E1 está envolvida na fusão do envelope viral à membrana celular. Em E2 também existe um domínio que interage com a proteína do capsídeo na face interna do envelope viral (HELENIUS e KARTENBECK, 1980; CHENG *et al.*, 1995;).

A proteína do capsídeo é responsável pela montagem do capsídeo e possui uma região de ligação ao genoma, como demonstrado em estudos com o SINV (GEIGENMULLER-GNIRKE *et al.*, 1993). Assim como ocorre nos demais alfavírus, esta proteína também pode ter um papel importante no processo de liberar o genoma do capsídeo (GASPAR *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram grande afinidade entre a proteína p3 e os ribossomos, sugerindo que ela é a responsável pela maior tradução do RNA viral sobre o RNA celular (ROSAS, 1997). Mitchell *et al.* (1997) relataram que grande quantidade da proteína p3 é transportada para o núcleo, tanto nos estágios iniciais quanto nos estágios finais da infecção em células de *Aedes albopictus*. Desse modo, poderia haver algum envolvimento entre o transporte dessa proteína para o núcleo e a eficiência da replicação dos alfavírus em células de invertebrados.

Em seu estudo, Mezencio e Rebello (1993) verificaram que a primeira proteína a aparecer em células infectadas com MAYV foi a proteína p3, após 5h de infecção em células de *Aedes albopictus*, e após 6h em células BHK-21. As demais proteínas apareceram cerca de 8h p.i. Com 12h, a síntese de proteínas do hospedeiro já diminuía. Nesse estudo, também foram identificadas três outras proteínas: de 110 kDa (provavelmente a poliproteína precursora traduzida a partir do RNA subgenômico 26S), outra de 62 kDa e ainda outra de 64 kDa (obtidas a partir da clivagem proteolítica de p110). As duas últimas são precursoras das proteínas de 50 kDa e 54 kDa, respectivamente.

2.1.1.4. Proteínas não-estruturais

As proteínas não-estruturais (nsp) são traduzidas a partir do RNA genômico como uma ou duas poliproteínas, dependendo da espécie de

alfavírus. Alguns apresentam um códon de parada entre nsp3 e nsp4 que pode ser lido ou não, dando origem a uma poliproteína nsp123 ou nsp1234, respectivamente (LAVERGNE *et al.*, 2006).

A proteína nsp1 parece ser importante para o início e continuação da síntese da fita de RNA complementar (senso negativo), além de participar do processo de metilação (*cap*) da extremidade do RNA genômico e subgenômico durante a transcrição. Outra possível função de nsp1 seria modular a atividade de proteinase de nsp2 (STRAUSS e STRAUSS, 1994). A proteína nsp2 apresenta atividade de proteinase, clivando a poliproteína nsP1-4 durante sua tradução. Além disso, estudos demonstraram uma possível atividade de RNA helicase (domínio N-terminal), que seria responsável em abrir a fita dupla de RNA durante a replicação e transcrição. Também verificou-se que nsp2 parece ser necessária para a síntese do RNAm subgenômico 26S. A função da proteína nsp3 ainda é desconhecida e nsp4 é RNA polimerase viral, altamente regulada durante a infecção viral (STRAUSS e STRAUSS, 1994).

2.1.1.5. Replicação viral

Como todos os demais arbovírus, o MAYV é capaz de infectar e replicar-se tanto em células de vertebrados como em células de invertebrados (MEZENCIO, *et al.*, 1989;1990). Os mecanismos envolvidos durante a replicação viral ainda são desconhecidos. Muitos estudos procuram evidenciar as respostas celulares à infecção pelo MAYV para melhor compreender seus mecanismos de infecção e patogênese.

Estudos sobre a morfogênese do MAYV em células de vertebrados indicam que as partículas do vírus são montadas no citoplasma, recobrando a face interna da membrana de vesículas e ao longo da face interna da membrana do retículo endoplasmático. A maturação das partículas e o brotamento ocorrem principalmente a partir da membrana plasmática, sendo que o brotamento a partir das vesículas com a posterior exocitose dos vírions maduros também ocorre de modo considerável (MEZENCIO *et al.*,

1990). Já em células de invertebrados, o início da infecção também apresenta corpos de inclusão contendo vírions imaturos, mas não foi observado o brotamento do vírus a partir destes e nem a partir da membrana plasmática. Acredita-se que a liberação dos vírions maduros ocorra por exocitose, devido aos grandes agregados de partículas virais presentes no meio extracelular. A exocitose seria um importante mecanismo para que o MAYV mantenha um estado de infecção persistente nas células de invertebrados (MEZENCIO *et al.*, 1989). Outra diferença observada é com relação à presença dos corpos de inclusão nos estágios finais da infecção, sendo estes raros em células de vertebrados. Nas células de *Aedes albopictus*, os corpos de inclusão são encontrados durante todo o ciclo de infecção (MEZENCIO *et al.*, 1989;1990).

A inibição da replicação do MAYV tem sido estudada por vários pesquisadores. Estudos sobre o efeito de bases fracas na morfogênese do MAYV demonstraram que ocorre uma inibição da produção de vírions em células de vertebrados. A morfogênese do MAYV foi afetada com prejuízo do transporte para a membrana plasmática. Grande número de partículas virais acumulou-se dentro de vacúolos e vários precursores do vírus se dispersaram no citoplasma. Essa maturação intracelular ocorrida foi semelhante à maturação do vírus em células de invertebrados. A alteração de pH poderia ter afetado várias enzimas responsáveis pelo transporte de vesículas através do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi em direção à membrana plasmática (FERREIRA *et al.*, 2000). Além disso, a síntese de proteínas virais diminuiu e a de proteínas celulares aumentou. O IFN- α (interferon alfa) também afeta a morfogênese do MAYV, inibindo drasticamente a síntese das proteínas estruturais p54, p50 e seus precursores p110 e p62, além da proteína do capsídeo p34 (FERREIRA e REBELLO, 1998). Acredita-se que a diminuição da proteína p34 poderia levar a menor síntese de proteínas virais, diminuindo assim a replicação do MAYV (FERREIRA *et al.*, 2000).

Já em células tratadas com choque térmico, Virgílio *et al.* (1997) constataram um possível papel das chaperonas HSP (*heat shock protein*) na manutenção de um estado antiviral em células infectadas com o MAYV. A principal ação das chaperonas ocorreria em nível nuclear, interagindo com a

proteína do capsídeo p34, cuja presença no núcleo é necessária para a replicação do MAYV em células de invertebrados, e também poderia ser necessária em células de vertebrados, como já demonstrado para o SFV (MICHEL *et al.*, 1994; VIRGILIO *et al.*, 1997; MITCHELL *et al.*, 1997).

2.1.1.6. Patogênese da febre Mayaro

Os sintomas causados pela infecção do MAYV são semelhantes aos sintomas causados por várias arboviroses, entre elas a dengue (PINHEIRO e LeDUC, 1998; TESH *et al.*, 1999; FIGUEIREDO *et al.*, 2004). As manifestações clínicas mais freqüentes consistem em febre, artralgia e exantema (PINHEIRO e LeDUC, 1998).

Os sintomas iniciais têm, em média, duração de 3 a 5 dias (CAUSEY e MAROJA, 1957). A infecção pelo MAYV é caracterizada inicialmente por febre abrupta e artralgias, sintomas que ocorrem na totalidade dos pacientes. A artralgia é um sintoma importante e costuma ser mais intensa nas pequenas articulações das extremidades dos membros superiores e inferiores. Ocorrem ainda cefaléia, calafrios, mialgias e astenia, dor epigástrica, náuseas, dor lombar, além de dores difusas pelo corpo e fotofobia (CAUSEY e MAROJA, 1957, PINHEIRO *et al.*, 1981). Dor retroorbital e *rash* também já foram descritos (PINHEIRO e LeDUC, 1998). A erupção é do tipo maculopapular e, embora em alguns casos seja generalizada, na maioria dos pacientes atinge com intensidade o tórax, o dorso, os braços e as pernas. O exantema surge geralmente no quinto dia da doença e sua persistência é de aproximadamente três dias (PINHEIRO *et al.*, 1981).

Na maioria dos casos a febre Mayaro é autolimitada, com o desaparecimento dos sintomas entre 3 e 10 dias, com a evolução do quadro para cura sem seqüelas. No entanto, a artralgia pode estender-se por muitos meses, precedendo à febre em alguns casos, ocasionando poliartrite moderada a severa, e às vezes incapacitante (PINHEIRO e LeDUC, 1998). Há um relato de artralgias crônicas e recorrentes após 6 meses da infecção

pelo MAYV em um paciente na Bolívia (TAYLOR *et al.*, 2005). No México, dois pacientes infectados com MAYV apresentaram hemorragias, com plaquetopenia e icterícia, e um deles faleceu com sintomas de encefalite, 30 dias depois da internação (NAVARRETE-ESPINOSA e GÓMEZ-DANTÉS, 2006).

Embora a transmissão do MAYV seja feita através da picada do vetor, outras formas de transmissão também podem ocorrer. Já foi descrito um caso de contaminação laboratorial com o MAYV, provavelmente por meio de aerossóis (JUNT *et al.*, 1999).

2.1.1.7 Diagnóstico da febre Mayaro

O isolamento do agente é o melhor método conhecido para a identificação do arbovírus responsável pela doença ou infecção (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a).

Para o diagnóstico da febre Mayaro pode-se isolar *in vivo* o vírus a partir de inoculações em cérebro de camundongos neonatos ou, *in vitro*, a partir de cultura de células de vertebrados (VERO, BHK-21) ou de invertebrados (*Aedes albopictus* clone C6/36). A identificação do vírus pode ser feita por fixação do complemento, inibição da hemaglutinação, soroneutralização ou por imunofluorescência (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a).

Testes moleculares também têm sido propostos. Uma técnica baseada na PCR foi desenvolvida para identificar os principais alfavírus encontrados no Brasil, entre eles o MAYV. É bastante sensível para ser usada como vigilância e para o diagnóstico (BRONZONIA *et al.*, 2004).

No entanto, técnicas baseadas na identificação do vírus tornam-se difíceis de serem utilizadas quando a amostra é coletada depois do aparecimento dos sintomas, uma vez que o MAYV apresenta um curto período de viremia, de 2 a 3 dias (VASCONCELOS *et al.*, 1998). Nestas situações os testes sorológicos oferecem bons resultados.

A inibição da hemaglutinação (IH) é muito usada na rotina para diagnóstico do MAYV, sendo um teste sensível, de baixo custo e de fácil execução. Apresenta a desvantagem de necessitar de hemácias de ganso freqüentemente, além da coleta de duas amostras de sangue para confirmação do diagnóstico, com intervalo de 15 dias. Um aumento no título de 4 vezes entre as amostras confirma o diagnóstico da doença. A IH também é ideal para estudos soropidemiológicos, pois anticorpos detectados pela IH aparecem na primeira semana após o início da doença e persistem por longo período de tempo (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a).

A fixação do complemento (FC) também pode ser usada para identificação de anticorpos antimayaro. Esta técnica, embora menos sensível, é mais específica que a IH. Os anticorpos detectados pela FC aparecem mais tardiamente (2 semanas após o início da doença) e podem persistir em títulos moderados ou altos por períodos prolongados (pelo menos 2 anos). A principal desvantagem deste teste é sua execução, pois sem treinamento adequado do laboratorista dificulta-se sua padronização a fim de obter resultados confiáveis (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a).

O teste de soroneutralização (SN) viral é um procedimento sorológico básico em virologia. Seu alto grau de especificidade imunológica o credencia como padrão-ouro quando outros procedimentos sorológicos são avaliados. A neutralização viral é definida como a perda da infectividade através da reação do vírus com o anticorpo específico. Anticorpos neutralizantes podem ser medidos por testes *in vivo* e *in vitro*. Apresenta a desvantagem de ser uma técnica trabalhosa e dispendiosa, ficando reservada a centros de pesquisa (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a). Para esta técnica também são necessárias duas amostras de soro com intervalos de 15 dias para confirmação do diagnóstico.

O ELISA é amplamente utilizado no diagnóstico viral por ser muito sensível e não exigir equipamentos sofisticados. O ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) permite realizar o diagnóstico presuntivo de infecção recente ou ativa, com uma única amostra de soro do paciente colhida na fase aguda da doença. Estudos indicam que anticorpos IgM são detectáveis no soro de pacientes com viremia, geralmente 4 a 5

dias depois do conjunto inicial dos sintomas, sendo considerados positivos títulos maiores do que 400 (PINHEIRO *et al.*, 1981; TESH *et al.*, 1999,). Figueiredo *et al.* (1989) padronizaram um MAC-ELISA com grande sensibilidade para detecção de anticorpos antimayaro. Em seu trabalho, Torres *et al.* (2004) observaram a persistência de títulos de IgM contra o MAYV por pelo menos 3 meses após a infecção pelo vírus. No entanto, em caso de infecção secundária, a produção de IgM pode ocorrer em níveis baixos, às vezes não detectáveis (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a).

2.2. Reações de aglutinação no diagnóstico laboratorial

A reação de aglutinação caracteriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação entre anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos em sua superfície (SANCHEZ, 2001).

A aglutinação pode ocorrer tanto com partículas que apresentam determinantes antigênicos naturais em sua superfície (hemácias, bactérias, protozoários, fungos) como com partículas inertes (partículas de látex, poliestireno, bentonita), ou mesmo com células antigenicamente não relacionadas (hemácias, bactérias), às quais se adsorvem ou se fixam antígenos solúveis. No primeiro caso, a reação é de aglutinação direta, e nos demais casos, aglutinação indireta ou passiva (SANCHEZ, 2001).

As reações de aglutinação são muito empregadas no diagnóstico laboratorial de doenças causadas por vírus (rubéola, sarampo, influenza, enterovírus, HBV, HCV), bactérias (salmonelose, brucelose, rickettsiose, leptospirose, sífilis), protozoários (toxoplasmose, tripanossomíase) e fungos (candidíase, criptococose, aspergilose), doenças auto-imunes (artrite reumatóide), na detecção de hormônios (β -gonadotrofina coriônica humana) e na tipagem de grupos sanguíneos dos sistemas ABO e Rh (SANCHEZ, 2001).

2.2.1. Aglutinação indireta em amostras de sangue total

Francis *et al.* (1988) desenvolveram um ensaio de aglutinação indireta para a detecção de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde a glicoproteína 120 (gp120) do envelope viral foi adsorvida a partículas de poliestireno de 0,5 μm . Neste ensaio, uma gota do sangue do paciente (25 μL) é colocada em um cartão de plástico e misturada com 15 μL de uma suspensão de partículas de látex recobertas com gp120. Após 5 a 8 minutos de agitação suave, uma reação de aglutinação visível é observada, caso o paciente apresente anticorpos contra o HIV.

A doença do sono ou tripanossomíase africana é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* em países da África central e do oeste, sendo uma das principais doenças na África subsaariana. Vários estudos têm sido realizados para facilitar o diagnóstico dessa doença, com ênfase nas técnicas que possam ser realizadas no campo. Jamonneau *et al.* (2000) avaliaram o ensaio de aglutinação indireta LATEX/*T.b. gambiense* (BÜSCHER *et al.*, 1991; 1999) a partir de amostras de sangue total com e sem diluição. O LATEX/*T.b. gambiense* consiste de uma suspensão de partículas de poliestireno recobertas com 3 determinantes antigênicos de superfície do *T. brucei gambiense*. Cerca de 20 μL de sangue total são misturados com 20 μL da suspensão de látex, e decorridos 5 minutos de agitação, percebe-se aglutinação macroscópica caso o paciente apresente anticorpos contra o *T. brucei gambiense*. O ensaio apresentou sensibilidade de 98,1%. Segundo Penchenier *et al.* (2003), o ensaio LATEX/*T.b. gambiense* pode ser usado para a triagem em massa da doença do sono em populações da África Central.

Outra doença causada por um tripanossoma também tem como método diagnóstico a aglutinação indireta a partir do sangue total: a surra, uma importante doença endêmica que afeta os rebanhos de búfalos do Vietnã, causada pelo *Trypanosoma evansi*. Holland *et al.* (2002) avaliaram a utilização de sangue total no ensaio LATEX/*T. evansi* (VERLOO *et al.*, 1998; 2000) para o diagnóstico de tripanossomíase em búfalos, concluindo ser

possível utilizá-lo no teste de aglutinação indireta sem prejuízo da sensibilidade ou especificidade do ensaio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

Células VERO foram cultivadas em meio Leibovitz L-15-C (meio L-15 suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino), acondicionadas em garrafas de poliestireno (25 cm²) e incubadas a 37°C. Após a confluência das células, as garrafas contendo aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células foram lavadas com solução de verseno (EDTA 0,05M 2% em PBS pH 7,2; 0,15 mL de vermelho de fenol 1%) e as células repicadas utilizando-se solução de tripsina 0,25% em verseno. As células foram ressuspensas em meio L-15-C e passadas para três novas garrafas e mantidas em estufa a 37°C até a confluência das células para um novo repique.

3.2. Multiplicação do vírus Mayaro e preparo do estoque viral padrão

Obtidas as culturas de células VERO recém-confluentes, o meio de cultura foi descartado e foi adicionada suspensão de partículas do MAYV (ATCC nº VR-66). As garrafas foram incubadas a 37 °C por 1h, sob agitação em intervalos de 5 minutos. Após esse período, adicionou-se meio L-15-MAN (meio L-15 suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B e 1% de soro fetal bovino), e as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C até a observação do efeito citopático (ECP), com lise de aproximadamente 90% das células. O sobrenadante foi centrifugado a 4.100 g, 4 °C por 30 min, e as alíquotas do

sobrenadante foram dispensadas em frascos eppendorf e em seguida armazenadas a -80 °C.

3.3. Titulação do estoque viral padrão

O título viral foi determinado segundo método de contagem de placas de lise descrito por Dulbecco (1952) com modificações. Uma alíquota do estoque padrão foi diluída em meio L-15-MAN com fator de diluição 10 (10^{-1} até 10^{-9}). Células VERO recém-confluentes foram repicadas, conforme descrito no item 3.1, até a obtenção de garrafas com células confluentes. Estas foram infectadas com diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} do MAYV, em triplicata. Após a incubação das garrafas em temperatura ambiente por 1h, o meio de cultura foi descartado e foi adicionado meio L-15-SS (meio L-15 contendo ágar 0,9%, 500 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2,5 µg/mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino). As garrafas foram então incubadas em estufa 37 °C até observação do ECP, quando foram coradas (cristal violeta 1%; formaldeído 4%) e as placas de lise contadas para cálculo do título do MAYV (PFU/mL). Como controle utilizaram-se garrafas contendo 500 µL de meio L-15-MAN, submetidas aos mesmos procedimentos descritos para as garrafas infectadas.

3.4. Multiplicação do MAYV para obtenção de proteínas virais

Para obter proteínas virais em grande quantidade, células VERO foram cultivadas em garrafas de poliestireno de 150 cm² contendo aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células, infectadas com suspensão de partículas virais do estoque padrão (item 3.2) com MOI 1. Constatada lise de aproximadamente 90% das células, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C.

3.5. Concentração das partículas virais

A concentração das partículas virais foi realizada segundo método descrito por Gaspar *et al.* (2001), com modificações. Cerca de 900 mL do sobrenadante de culturas de células infectadas com MAYV (item 3.4), foram centrifugadas a 10.000 *g*, 4 °C por 1h para retirada dos fragmentos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 90.000 *g*, 4 °C por 90 min. O sedimento foi ressuspensão em PBS pH 7,2 , aplicado no topo de um gradiente contínuo de sacarose 5-50%, e ultracentrifugado a 90.000 *g* por 2h. Foram coletadas 5 frações do gradiente denominadas ML1, ML2, MB1, MB2 e MPEL, conforme esquema apresentado na Figura 3, para posterior identificação das proteínas virais por eletroforese. Após análise do perfil eletroforético, as frações contendo as proteínas virais concentradas foram rotuladas e armazenadas a -80 °C.

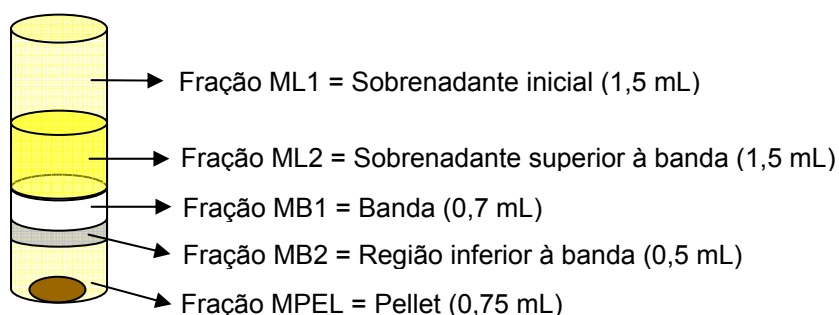


Figura 3 – Esquema mostrando as frações coletadas do gradiente. Entre parêntesis, o volume coletado de cada fração.

3.6. Identificação das proteínas do MAYV

As proteínas do MAYV foram caracterizadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (LEAMMLI, 1970) e coradas com

nitrito de prata (BLUM *et al.*, 1987). As massas moleculares das proteínas virais foram estimadas correlacionando-se, por meio de curva padrão, os perfis de migração de proteínas do padrão de massa molecular com o logaritmo da massa molecular. Os marcadores de massa molecular utilizados foram galactosidase (116,0 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), álcool desidrogenase (37,6 kDa) e anidrase carbônica (28,5 kDa).

3.7. Dosagem das proteínas virais

A dosagem das proteínas virais foi realizada segundo método descrito por Bradford (1976). Um volume de 0-100 µL das preparações foi misturado com 1 mL do reagente de Bradford e a absorbância das amostras foi determinada a 595 nm. Para cálculo do teor protéico utilizou-se uma curva padrão construída com 0-20 µg de albumina sérica bovina.

3.8. Obtenção de anticorpos contra o MAYV

O líquido ascítico hiperimune de camundongo contra MAYV foi cedido pelo Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sendo rotulado como MIAF-MAY.

3.9. Acoplamento das partículas do látex com proteínas do MAYV (LPCM-MAY)

O acoplamento químico foi realizado segundo Büscher *et al.* (1991), com modificações. As partículas de poliestireno modificadas contendo

grupos carboxila (CLB-4, Sigma[®]) foram lavadas com solução tampão MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado) 0,1 M pH 5,5 a 12.000 g por 15 min. Em seguida, adicionou-se EDC 2% (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida HCl), e as partículas foram incubadas a temperatura ambiente por 4h a 180 rpm. Após lavagem com solução tampão MES, o sedimento foi ressuspensão em tampão borato 0,2 M pH 8,5 e incubado a temperatura ambiente por 45 min a 180 rpm. Após este período, adicionou-se as proteínas do MAYV e incubou-se a temperatura ambiente por 17h a 180 rpm. As partículas de látex foram então lavadas com tampão MES, e o sedimento ressuspensão em tampão borato. Em seguida, adicionou-se etanolamina 0,25 M para bloquear os sítios do látex ainda contendo grupos carboxila livres. Após incubação a temperatura ambiente por 30 min a 180 rpm, as partículas de poliestireno foram lavadas com tampão fosfato (PB) 0,01 M pH 7,2. Finalmente, o sedimento formado foi ressuspensão em PB 0,01 M pH 7,2 e armazenado a 4 °C.

3.10. Preparo de amostra de sangue humano contendo anticorpos antimayaro

Foram utilizadas amostras de sangue total, anticoagulado com EDTA, de doadores humanos saudáveis e em jejum de 12h. Após centrifugação para separação do plasma, as hemácias foram lavadas com PBS pH 7,2.

Para o preparo da amostra de sangue contendo hemácias humanas e anticorpos antimayaro, foram adicionadas diferentes diluições do MIAF-MAY (item 3.8) à suspensão de hemácias lavadas, conforme descrito por Büscher *et al.* (1991).

Foram constituídas as seguintes amostras:

- HH-MAY1 = 500 µL de hemácias lavadas + 500 µL de MIAF-MAY.
- HH-MAY500 = 500 µL de hemácias lavadas + 500 µL de MIAF-MAY diluído 1:500 em tampão borato 0,2M pH 8,5.
- HH-CONT = 500 µL de hemácias lavadas + 500 µL de PBS pH 7,2.

3.11. Estabelecimento do protocolo para realização do ENAGIS-MAY

3.11.1 ENAGIS-MAY em amostras de sangue humano

O ENAGIS-MAY foi padronizado para ser realizado em um cartão de plástico de fundo negro utilizando-se 10 µL da suspensão do látex LPCM-MAY (item 3.9) e 20 µL do sangue contendo hemácias humanas e anticorpos antimayaro (item 3.10). O cartão foi movimentado em agitador horizontal do tipo Kline a 180 rpm. Após 5 minutos observou-se a presença ou ausência de aglutinação visível a olho nu.

3.11.2. ENAGIS-MAY em amostras de sangue humano impregnadas em papel de filtro

A utilização do ENAGIS-MAY para detectar anticorpos antimayaro em amostras de sangue humano impregnadas em papel de filtro foi padronizada segundo técnica descrita por Chappuis *et al.* (2002) com modificações. Uma gota de sangue (50 µL), obtida conforme descrito no item 3.10, foi aplicada em um disco de papel de filtro (Whatman® nº. 4) de 15 mm de diâmetro colocado no fundo do poço de uma microplaca. Após secagem a temperatura ambiente por 1h, foram adicionados 150 µL de tampão borato 0,2M, pH 8,5. Após incubação por 30 min a temperatura ambiente a 180 rpm, o eluído foi testado pelo ENAGIS-MAY. Para a realização do teste utilizou-se um cartão de plástico de fundo negro ao qual foram adicionados 10 µL do eluído e 10 µL do LPCM-MAY. Após agitação a 180 rpm durante 5 min, observou-se a presença ou ausência de aglutinação visível a olho nu.

3.12. Determinação da sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY

Para avaliar a sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY foi realizado um ensaio no qual animais foram infectados com MAYV para detecção de anticorpos por duas metodologias diferentes: ensaio de neutralização de placa em microcultura - ENPM (metodologia padrão) e ENAGIS-MAY. Um terceiro teste (látex de poliestireno modificado contendo grupos carboxila com albumina sérica bovina acoplada quimicamente – LPCM-BSA) foi utilizado para testar a presença de anticorpos contra albumina sérica bovina (BSA), um possível interferente capaz de originar resultados inespecíficos com o ENAGIS-MAY.

3.12.1. Ensaio biológico

Foram utilizados oito camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss com 30 dias de idade provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (processo nº 81/2007).

Os animais foram divididos em dois grupos de quatro animais cada. Os camundongos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e alimentos *ad libitum* por 30 dias (HUANG *et al.*, 2000).

Os animais do grupo M (M1, M2, M3 e M4) foram infectados no primeiro dia com 200 µL de suspensão de partículas virais (10^6 UFP) pela via intraperitoneal. Os animais do grupo C (C1, C2, C3 e C4) receberam 200µL de PBS.

Após 15 dias os animais receberam uma dose de manutenção. Os animais do grupo M foram infectados com 200 µL de suspensão de partículas virais (10^4 UFP) pela via intraperitoneal. Os animais do grupo C receberam 200 µL de PBS.

No 30º dia foi realizada a coleta de sangue dos animais por punção cardíaca. Cerca de 50 µL de sangue total de cada animal foram impregnados em papéis de filtro para realização do ENAGIS-MAY (item 3.11.2). O restante da amostra foi centrifugado e o soro armazenado a -20°C para a realização do ENPM (item 3.12.2).

3.12.2. Ensaio de neutralização de placa em microcultura das amostras de soro obtidas no ensaio biológico (ENPM)

O ensaio de neutralização de placa em microcultura foi realizado pela técnica descrita por Seawright *et al.* (1974). Os soros obtidos dos animais foram mantidos a 56°C durante 30 min para inativação das proteínas do complemento. Em seguida, foram diluídos em PBS com fator de diluição 2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32). A cada diluição foram adicionados 50 µL de uma suspensão estoque de MAYV (item 3.2) contendo 2×10^6 PFU na proporção de 1:1. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C durante 1h. Em seguida, as amostras foram aplicadas em microplacas de cultura (24 poços de 16 mm de diâmetro) contendo células VERO recém-confluentes, em duplicata. Após incubação por 1h a temperatura ambiente sob agitação, o meio de cultura foi removido dos poços, e adicionaram-se 750 µL de meio L-15-SS. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C até o ECP. As células foram tratadas com corante vital (vermelho neutro 1% diluído 1:10.000 em L-15-MAN) e as placas de lise foram contadas (olho nu) para posterior cálculo do CED_{50} (título de anticorpos capaz de promover a redução de 50% das placas de lise) de cada amostra.

3.12.3. Pesquisa de anticorpos contra albumina sérica bovina (LPCM-BSA)

Para a pesquisa de anticorpos contra albumina sérica bovina foi utilizado o LPCM-BSA. O método de acoplamento utilizado foi o mesmo descrito para o acoplamento de proteínas do MAYV (item 3.9), porém utilizou-se BSA fração V (Reagen[®]) ao invés das proteínas do MAYV para a reação de acoplamento químico.

O ensaio foi realizado nas mesmas condições padronizadas para o ENAGIS-MAY realizado em amostras de sangue impregnadas em papel de filtro (item 3.11.2).

3.13. Análise Estatística

Análises de regressão linear foram calculadas para determinação do CED₅₀ no ENPM. Para avaliar os resultados encontrados por esta técnica utilizou-se o teste de Mann-Whitney bilateral, sendo significativos valores de $p < 0,05$.

Para comparar os resultados encontrados pelo ENAGIS-MAY e pelo ENPM das amostras do ensaio biológico utilizou-se o teste de Fisher bilateral, considerando resultados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Infecção de células VERO pelo *Mayaro virus* e observação do efeito citopático

O vírus Mayaro é capaz de infectar e se replicar em células de mamíferos (MEZENCIO *et al.*, 1989; 1990). Células VERO (células fibroblásticas derivadas da cápsula renal de macacos Rhesus), infectadas com MAYV, apresentaram ECP entre 24 e 48 h. Na Figura 4 observa-se ECP em VERO infectadas com MAYV.

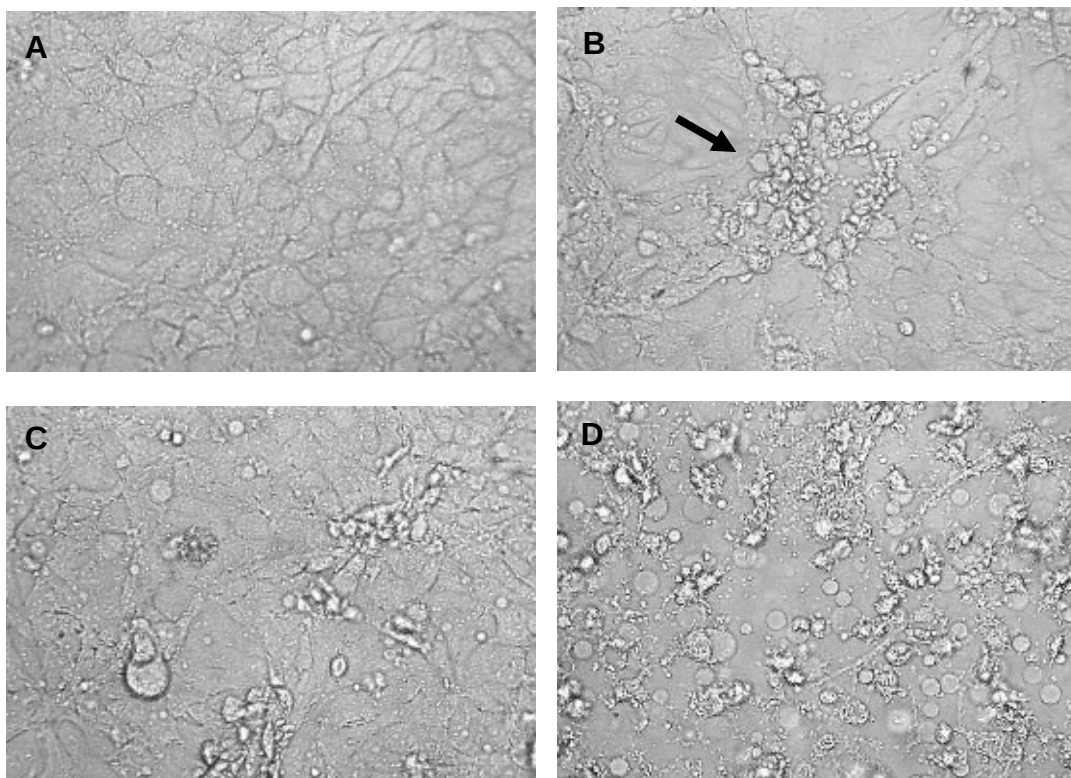


Figura 4 - Fotomicrografia de cultura contendo células VERO em meio L-15-MAN infectadas com MAYV (MOI 1), aumento de 320x. **A** – Controle após 72h de incubação; **B** – Infectada com MAYV 24h p.i. A seta indica o início da formação de uma placa de lise; **C** – Infectada com MAYV 48h p.i.; **D** - Infectada com MAYV 72h p.i.. Observa-se grande quantidade de fragmentos celulares.

Segundo MEZENCIO *et al.* (1990), as partículas do MAYV são liberadas por brotamento a partir de vesículas em células de vertebrados, principalmente a partir da membrana plasmática. A Figura 4 mostra que 24h p.i. as culturas de células VERO começaram a apresentar ECP, com início da formação de uma placa de lise (seta na Figura 4B). As placas de lise são formadas por vírus que brotam a partir de células infectadas, as quais liberam vírions capazes de infectar células adjacentes. Após 48h de incubação, observou-se o aparecimento de muitas células mortas no sobrenadante, em decorrência da replicação viral (Figura 4C). Após 72h, a maioria das células estava lisada (Figura 4D), com a monocamada totalmente destruída e com grande quantidade de fragmentos celulares em suspensão. As culturas-controle permaneceram com a monocamada íntegra durante todo o período de incubação (Figura 4A).

4.2. Titulação do estoque viral padrão

Utilizando o método de contagem de placas de Dulbecco (1952), o estoque viral foi titulado conforme descrito em Material e Métodos (item 3.3).

O título do MAYV estoque encontrado foi $5,9 \times 10^8$ PFU/mL (Apêndice 2), similar aos obtidos por outros pesquisadores. Mezencio *et al.* (1989; 1990) obtiveram títulos máximos de 3×10^9 PFU/mL e $9,5 \times 10^{10}$ PFU/mL em células de *Aedes albopictus* e de BHK-21, respectivamente. Freitas *et al.* (2006) obtiveram títulos de $2,6 \times 10^8$ PFU/mL em células BHK-21. Todos estes trabalhos demonstraram a capacidade do MAYV em crescer em células de vertebrados e de invertebrados, proporcionando altos títulos.

4.3. Identificação das proteínas do MAYV

Cada uma das frações coletadas a partir do gradiente de sacarose (Figura 3, item 3.5) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida

12% (SDS-PAGE) (LEAMMLI, 1970) e o gel corado com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). Foram adicionados 10 µL de cada amostra e 10 µL de tampão de corrida, aquecidos a 100°C por 3 min e aplicados 10 µL no gel de poliacrilamida 12 %. O gel foi submetido à tensão de 20V durante 8h, e em seguida corado com nitrato de prata 0,2%. O perfil de bandas obtido está apresentado na Figura 5.

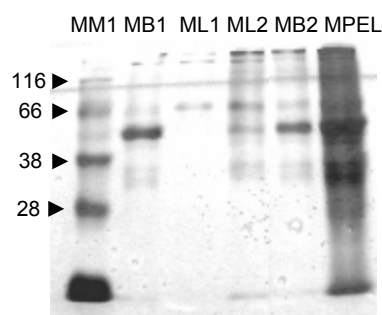


Figura 5 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado pela prata das frações coletadas do gradiente de sacarose 5-50%. **MM1**- Padrão de massa molecular de proteínas (as pontas de seta indicam a massa molecular em kDa); **MB1** – fração MB1; **ML1** – fração ML1; **ML2** – fração ML2; **MB2** – fração MB2; **MPEL** – fração MPEL.

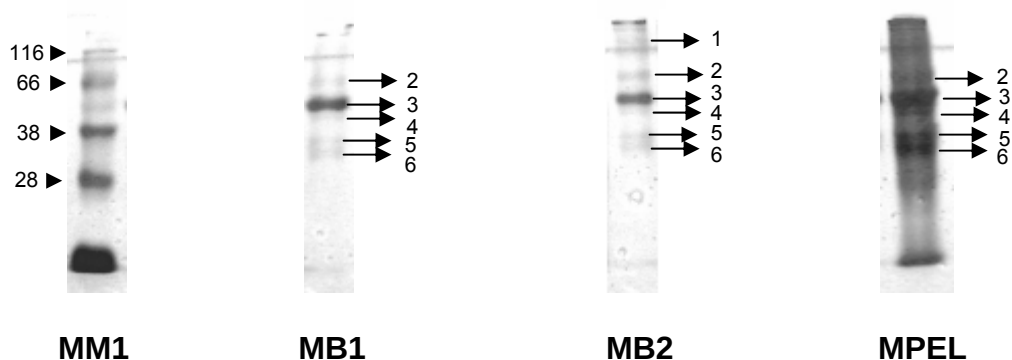


Figura 6 – Discriminação do perfil de bandas obtido pela eletroforese das frações do gradiente da Figura 5. **MM1**- Padrão de massa molecular de proteínas (as pontas de seta indicam a massa molecular em kDa); **MB1** – fração MB1 (os números indicam as prováveis proteínas virais); **MB2** – fração MB2; **MPEL** – fração MPEL.

De acordo com o perfil eletroforético apresentado, pôde-se verificar que a fração da banda do gradiente de sacarose - MB1 (Figuras 5 e 6) apresentou 5 bandas: uma banda forte (banda 3, Figura 7-MB1) e outra fraca (banda 4, Figura 6-MB1) na região entre 38 e 66 KDa; outra banda

fraca (banda 2, Figura 6-MB1) próximo aos 66 KDa e duas outras também fracas (bandas 5 e 6, Figura 6-MB1) na região próxima a 38 KDa. Perfil semelhante foi encontrado para a fração MB2 (Figuras 5 e 6), que além destas bandas descritas acima também apresentou uma banda fraca próxima à região de 116 KDa (banda 1, Figura 6-MB2).

A fração MPEL (Figuras 5 e 6), correspondente ao sedimento formado no tubo de gradiente após centrifugação, apresentou um perfil de bandas semelhante ao perfil encontrado para a fração MB1, porém com uma intensidade maior para todas as bandas.

A fração ML2 (Figura 5) também apresentou o mesmo perfil de bandas encontrado para MB1 e MB2, porém a banda correspondente à banda 3 foi bem menos intensa.

A fração ML1 (Figura 5) apresentou apenas uma banda na região próxima a 66 KDa.

Com base nesses resultados e comparando-se com o trabalho de Mezencio e Rebello (1993), as bandas encontradas provavelmente correspondem às proteínas do MAYV, uma vez que as massas moleculares relativas são aproximadas. A Tabela 1 mostra a correspondência das massas moleculares das bandas encontradas nas frações MB1, MB2, ML2 e MPEL com as massas moleculares relativas das proteínas do MAYV descritas por Mezencio e Rebello (1993). Os dados utilizados para determinação das massas moleculares relativas das proteínas virais estão descritos no Apêndice 1.

Tabela 1 – Correspondência entre as bandas encontradas na eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações MB1, MB2, ML2 e MPEL, coletadas do gradiente de sacarose 5-50%, com as massas moleculares relativas das proteínas identificadas do MAYV, conforme descrito na literatura.

Banda encontrada ^a	Massa molecular relativa ^b	Proteína MAYV ^c	Massa molecular relativa ^d
banda 1	97 kDa	poliproteína	110 kDa
banda 2	68 kDa	precursoras de p1 e p2	62-64 kDa
banda 3	54 kDa	p1	54 kDa
banda 4	50 kDa	p2	50 kDa
banda 5	34 kDa	p3	34 kDa

a – bandas encontradas nas frações MB1, MB2, ML2 e MPEL.

b – massas moleculares relativas calculadas a partir do padrão de massa molecular.

c – proteínas do MAYV identificadas por Mezencio e Rebello (1993).

d – massas moleculares relativas das proteínas do MAYV identificadas por Mezencio e Rebello (1993).

De acordo com outros trabalhos, o perfil eletroforético das frações MB1, MB2, ML2 e MPEL apresenta um padrão de bandas compatível com o MAYV, sendo identificadas as prováveis proteínas p110, p62-64, p54, p50 e p34 (MEZENCIO e REBELLO, 1993; VIRGÍLIO *et al.*, 1997; ROSAS *et al.*, 1997; FERREIRA e REBELLO, 1998; ISHIMARU *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2000).

O aparecimento de duas bandas na região próxima a 34 kDa pode indicar que a banda 6 (Figura 6) seja correspondente a uma proteína presente nas vesículas e membranas celulares e que foi adquirida pelo vírus durante o brotamento.

Já na fração MPEL, o aparecimento de três bandas fortes (bandas 3, 4, e 5 da Figura 6-MPEL) correspondendo à p54, p50 e p34, respectivamente, indica que a maior parte das partículas virais foi arrastada para o fundo do gradiente, não sendo portanto totalmente concentrada na banda visualizada (fração MB1). Provavelmente as partículas virais estavam associadas a fragmentos ou proteínas celulares de maior massa, tendo sido arrastadas para o fundo do gradiente durante a centrifugação. Isto explicaria

porque a fração MPEL apresentou um perfil eletroforético de bandas de maior intensidade do que as frações MB1 e MB2.

Portanto, as frações MB1 e MB2 foram as que apresentaram maior grau de pureza de proteínas virais. Estas frações foram unidas e centrifugadas a 90.000 g, 4°C por 90 min, e o sedimento ressuspense em 500 µL de PBS e armazenado a -80 °C, sendo rotulado como MAYV-BANDA. As frações MPEL e ML2 também foram unidas e submetidas ao mesmo procedimento, e o sedimento obtido ressuspense em 1000 µL de PBS e rotulado como MAY-PEL.

A fração ML1 foi descartada, pois apresentou apenas uma banda (massa molecular relativa de 67 kDa) que provavelmente corresponde à albumina sérica bovina presente no soro fetal bovino do meio de cultura celular.

4.4. Dosagem das proteínas virais

A dosagem das proteínas virais presentes nas amostras MAY-BANDA e MAY-PEL foi realizada pelo método de Bradford (1976).

Tabela 2 – Concentrações de proteínas das amostras MAY-BANDA e MAY-PEL determinadas pelo método de Bradford (1976).

	Concentração	Total proteínas
MAY-BANDA	0,506 µg/mL	253 µg
MAY-PEL	0,510 µg/mL	510 µg

Conforme demonstrado na Tabela 2, a quantidade de proteínas de MAY-PEL foi cerca de duas vezes maior que em MAY-BANDA, confirmando os resultados apresentados pelo perfil eletroforético das amostras MB1, MB2 e MPEL (Figuras 5 e 6).

4.5. Avaliação do ENAGIS-MAY

O método de acoplamento químico das proteínas do MAYV ao látex de poliestireno modificado contendo grupos carboxila foi padronizado a partir do método proposto por Büscher *et al.* (1991).

O látex (CLB-4, Sigma[®]) apresenta numerosos grupos carboxila na superfície das micropartículas de poliestireno, os quais apresentam diâmetro de 0,4 µm. Esses grupos permitem uma ligação mais estável com grupamentos amina dos resíduos de aminoácidos que compõem peptídeos e proteínas. Essa ligação covalente é favorecida quando o látex é sensibilizado com substâncias contendo carbodiimida (NAKAJIMA e IKADA, 1995). A Figura 7 apresenta um esquema das etapas de acoplamento químico de proteínas às partículas de látex.

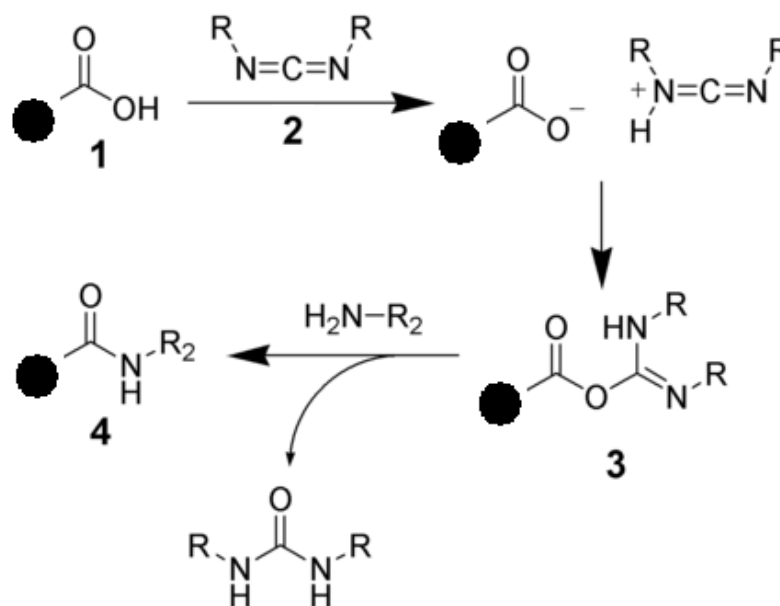


Figura 7 – Esquema das etapas de acoplamento químico de proteínas às partículas de látex de poliestireno modificado contendo grupos carboxila, favorecida pela ação de um agente acoplador (carbodiimida). **1** – Látex de poliestireno modificado contendo grupos carboxila; **2** – Carbodiimida; **3** – Formação do intermediário o-acilisourea; **4** – Látex ligado covalentemente a um aminoácido por uma ligação amida. Adaptado de Nakajima e Ikada (1995).

Após a padronização das condições ideais para o acoplamento das proteínas virais (item 3.9), fez-se um teste para comprovar a ligação das proteínas virais ao látex de poliestireno modificado contendo grupos carboxila (LPCM-MAY) através da reação deste com anticorpos contra MAY. Para isso, adicionaram-se 10 μ L de LPCM-MAY a 10 μ L de MIAF-MAY em um cartão de plástico de fundo negro. A mistura foi homogeneizada com bastão de plástico e mantida sob agitação a 180 rpm durante 5 min. Em seguida fez-se a leitura, sendo considerada positiva a amostra que apresentou aglutinação visível. Como controle negativo foram utilizados 10 μ L de LPCM-MAY e 10 μ L de solução tampão borato 0,2 M pH 8,5. Como apresentado na Figura 8.1, o LPCM-MAY reagiu com o MIAF-MAY. O controle negativo permaneceu sem formação de aglutinados visíveis (Figura 8.6). Para determinar o título de anticorpos antimayaro na amostra, MIAF-MAY foi diluído em série em tampão borato. Os resultados são apresentados nas figuras 8, 9 e 10.

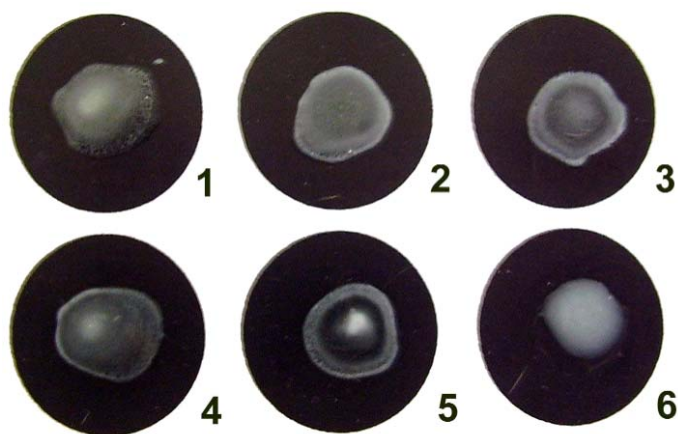


Figura 8 – Reação de aglutinação passiva do LPCM-MAY e anticorpos MIAF-MAY em diferentes diluições após 5 min de agitação a 180 rpm. **1)** 10 μ L de MIAF-MAY + 10 μ L de LPCM-MAY ; **2 a 5)** MIAF-MAY diluído 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10 em tampão borato 0,2M pH 8,5, respectivamente; **6)** Controle negativo (10 μ L de borato 0.2M + 10 μ L LPCM-MAY). As reações 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram aglutinação (reação positiva). A reação 6 não apresentou aglutinação (reação negativa).

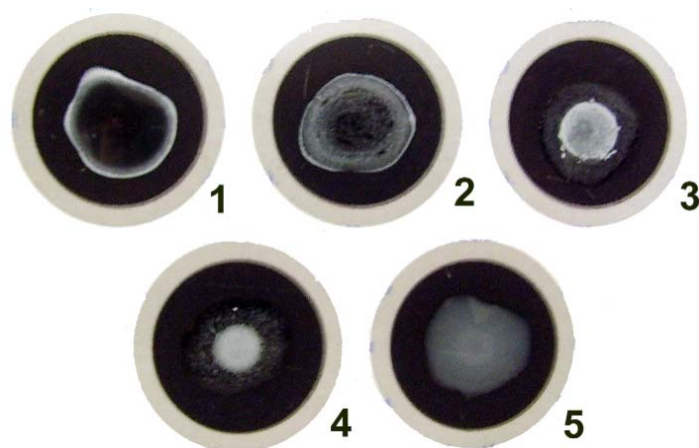


Figura 9 – Reação de aglutinação passiva do LPCM-MAY e anticorpos MIAF-MAY em diferentes diluições após 5 min de agitação a 180 rpm. **1 a 4)** MIAF-MAY diluído 1:20, 1:50, 1:100 e 1:500 em tampão borato 0,2M pH 8,5, respectivamente; **5)** Controle negativo (10µL de borato 0.2M). As reações 1, 2, 3 e 4 apresentaram aglutinados (positivas). A reação 5 não apresentou aglutinados (negativa).

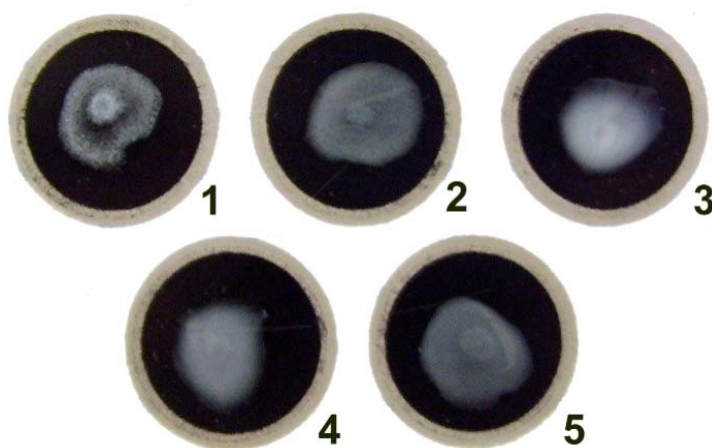
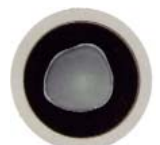


Figura 10 – Reação de aglutinação passiva do LPCM-MAY e anticorpos MIAF-MAY em diferentes diluições após 5 min de agitação a 180 rpm. **1 a 4)** MIAF-MAY diluído 1:5.000, 1:10.000, 1:50.000 e 1:100.000 em tampão borato 0,2M pH 8,5, respectivamente; **5)** Controle negativo (10µL de borato 0.2M). Apenas a reação 1 apresentou aglutinados (positiva). As reações 2, 3, 4 e 5 não apresentaram aglutinados considerados (negativas).

O título de anticorpos antimayaro presentes no MIAF-MAY foi igual a 5.000 (Figura 10.1). Nas maiores diluições, a formação dos aglutinados tornou-se maior, chegando-se aos grandes aglutinados centrais nas amostras de MIAF-MAY diluídas 1:100 e 1:500 (Figuras 9.3 e 9.4, respectivamente), pois as concentrações de antígenos e anticorpos atingiram o ponto de equivalência (SANCHEZ, 2001).

Na Tabela 3 é apresentado um critério para avaliar as reações do LPCM-MAY baseado nas observações descritas anteriormente e nos trabalhos de Jamonneau *et al.* (2000) e Xinglin *et al.* (2002).

Tabela 3 – Critério para avaliação das reações do LPCM-MAY, segundo análises visuais baseadas na titulação da amostra MIAF-MAY.

Intensidade da aglutinação ^a	Aspecto da reação	
	Descritivo	Visual
++++	Aglutinados grandes e centrais. Líquido com aspecto transparente.	
+++	Aglutinados grandes e marginais. Pouco ou nenhum aglutinado central. Líquido com aspecto transparente.	
++	Aglutinados pequenos e marginais. Líquido ligeiramente opaco.	
+	Aglutinados escassos e marginais. Líquido opaco.	
-	Ausência de aglutinados e líquido de aspecto opaco.	

^a – Resultado baseado em observações visuais, sem uso de equipamentos. Quando a aglutinação for ++ ou superior, a reação será considerada positiva para anticorpos antimayaro. Quando a aglutinação apresentar +, a reação será indeterminada. Quando não houver aglutinação visível, a reação será negativa. Critérios elaborados segundo Jamonneau *et al.* (2000) e Xinglin *et al.* (2002).

Confirmada a presença de proteínas virais no LPCM-MAY, procedeu-se ao teste da reação de aglutinação em presença de hemácias. Para isso, amostras constituídas de hemácias humanas e anticorpos antimayaro (HH-MAY500, item 3.10) foram utilizadas para reagir com LPCM-MAY, segundo protocolo descrito no item 3.11.1. Como controle negativo foi utilizada a amostra HH-CONT. Após a reação, a amostra HH-MAY500 apresentou um resultado positivo (aglutinado ++++) e diluições em tampão borato foram realizadas para obter o título de anticorpos antimayaro, conforme ilustrado na Figura 11.

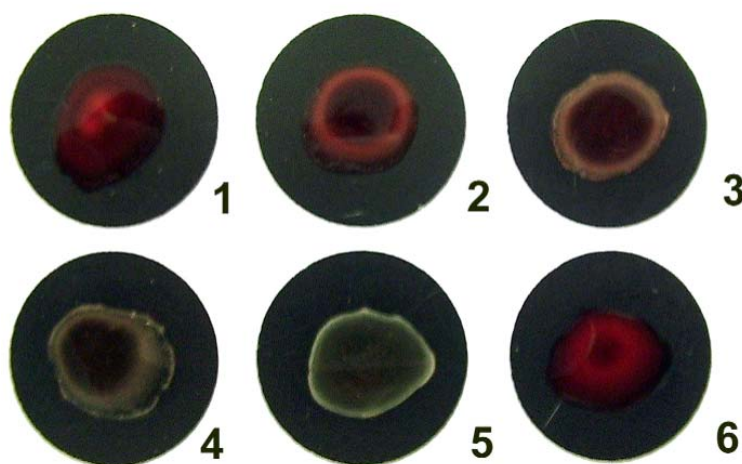


Figura 11 - Reação de aglutinação passiva do LPCM-MAY e amostra HH-MAY500 em diferentes diluições após 5 min de agitação a 180 rpm. **1)** 20µL de HH-MAY500 + 10 µL de LPCM-MAY ; **2 a 5)** HH-MAY500 diluído 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 em tampão borato 0,2M pH 8,5, respectivamente; **6)** 10 µL HH-CONT + 10 µL LPCM-MAY. As amostras 1, 2, 3 e 4 foram positivas. A amostra 5 foi considerada indeterminada e a amostra 6 negativa, segundo critérios pré-estabelecidos.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 11, o título da amostra HH-MAY500 foi 8, segundo os critérios apresentados na Tabela 3. A diluição 1:16 (Figura 11.5) apresentou apenas aglutinados escassos e marginais, não sendo considerada como reação positiva. O controle negativo (Figura 11.6) não apresentou aglutinados visíveis, apenas uma concentração central de hemácias.

O título de 8 encontrado para HH-MAY500 apresentou uma boa correlação com o resultado do título encontrado para a amostra MIAF-MAY, uma vez que fora diluída 500 vezes. Portanto, o ENAGIS-MAY foi capaz de detectar anticorpos antimayaro em presença de hemácias humanas.

4.6. Avaliação do ENAGIS-MAY em amostras de sangue humano impregnadas em papel de filtro

O ENAGIS-MAY em amostras de sangue impregnadas em papel de filtro foi padronizado para ser executado em condições nas quais o ensaio não pode ser realizado imediatamente após coleta do material, como por exemplo, em situações de trabalho em campo ou em locais de difícil acesso, como regiões de floresta ou em áreas rurais. Nestes casos, uma gota de sangue do indivíduo é aplicada em discos de papel de filtro para posterior análise pelo ENAGIS-MAY.

Para avaliação deste protocolo (ver item 3.11.2) foi utilizada amostra contendo hemácias humanas (item 3.10) com anticorpos antimayaro presentes no MIAF-MAY (HH-MAY1). Como controle negativo utilizou-se amostra HH-CONT.

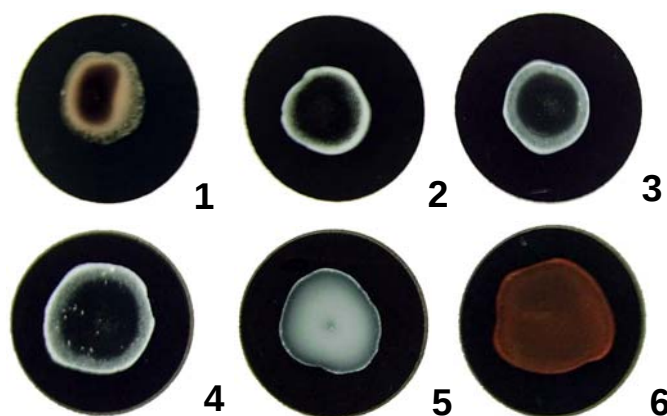


Figura 12 - Reação de aglutinação passiva do LPCM-MAY e amostra HH-MAY1 (impregnada em papel de filtro e eluída com tampão borato 0,2M pH 8,5), após 5 min de agitação a 180 rpm. **1)** 10µL de HH-MAY1 + 10 µL de LPCM-MAY . **2 a 5)** HH-MAY1 diluído 1:10, 1:50, 1:100 e 1:1.000 em tampão borato 0,2M pH 8,5, respectivamente; **6)** 10 µL de HH-CONT + 10 µL LPCM-MAY. As reações 1, 2, 3 e 4 foram positivas. As reações 5 e 6 foram negativas.

O título da amostra HH-MAY1 foi 100 (Figura 12.4). A amostra diluída 1:1000 (Figura 12.5) apresentou aglutinados escassos e marginais e o líquido com aspecto opaco, sendo esta reação considerada negativa. O controle negativo não apresentou aglutinados (Figura 12.6).

Portanto o ENAGIS-MAY mostrou-se capaz de detectar anticorpos antimayaro a partir de amostras de sangue impregnadas em papel de filtro. O título obtido (100) foi menor do que o encontrado quando a técnica foi realizada em amostras sem aplicação em papel de filtro (4.000). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos publicados, nos quais comparou-se uma técnica de aglutinação a partir de amostras de plasma e em amostras eluídas de papel de filtro (NOIREAU *et al.*, 1991; CHAPPUIS *et al.*, 2002) para detecção de anticorpos contra *Trypanosoma brucei gambiense*. Segundo os autores, também houve diminuição do título de anticorpos quando se utilizou o teste em amostras aplicadas em papel de filtro.

Para aplicações diagnósticas do ENAGIS-MAY seriam utilizadas duas amostras de sangue de um paciente com intervalo de 15 dias entre cada coleta, semelhante ao protocolo usado no diagnóstico de arboviroses através da inibição da hemaglutinação (IH) (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a; DELMONT, 2003; CHIPPAUX, 2003). Desse modo, seria avaliado não o título de uma amostra isolada, mas o aumento ou não da produção de anticorpos pelo indivíduo. Portanto, o menor título encontrado pelo ENAGIS-MAY em amostras impregnadas em papel de filtro não implicaria em uma perda da sensibilidade caso este seja utilizado para diagnóstico.

Outra vantagem em se utilizar o ENAGIS-MAY em amostras aplicadas em papel de filtro é a possibilidade de coletar várias amostras concomitantes, necessitando apenas de uma gota de sangue de cada paciente, e sem a necessidade de se fazer o teste na hora da coleta. Estudos demonstraram que amostras de sangue aplicadas em papel de filtro podem ser armazenadas em temperatura ambiente ou a 4°C por até 15 dias, sem perder a estabilidade e a reprodutibilidade (CHAPPUIS *et al.*, 2002).

4.7. ENAGIS-MAY das amostras de sangue dos animais do ensaio biológico

A presença de anticorpos contra MAYV foi detectada pelo LPCM-MAY em todas as amostras do grupo M. As amostras M1, M3, e M4 apresentaram título de 50. A amostra M2 apresentou o maior título (100) conforme dados apresentados na Tabela 4. Já entre os animais do grupo C, todos apresentaram reação negativa.

Tabela 4 – Resultado do ENAGIS-MAY com amostras de sangue dos camundongos dos grupos C e M. Amostras aplicadas em discos de papel de filtro e eluídas com tampão borato 0,2M pH 8,5, após 5 min de agitação a 180 rpm.

Animais	Amostra não diluída ^a	Amostras diluídas ^b			
		1:10	1:50	1:100	1:1000
M1	+	+	+	-	NT
M2	+	+	+	+	-
M3	+	+	+	-	NT
M4	+	+	+	-	NT
C1	-	NT	NT	NT	NT
C2	-	NT	NT	NT	NT
C3	-	NT	NT	NT	NT
C4	-	NT	NT	NT	NT

+ reação positiva para anticorpos antimayaro.

- reação negativa.

^a – 10µL do eluído .

^b – amostras eluídas e diluídas em tampão borato 0,2M pH 8,5.

NT – não testado.

M1 a M4 – camundongos infectados com MAYV.

C1 a C4 – camundongos que receberam PBS pH 7,2.

Os animais infectados foram capazes de desenvolver anticorpos contra o MAYV, sendo estes detectados pelo ENAGIS-MAY. Esses dados confirmam a capacidade do método e sua eficiência na utilização com amostras de sangue total impregnadas em papel de filtro.

A amostra utilizada como fonte de proteínas do MAYV para ser acoplada quimicamente ao látex (MAY-PEL) apresentou várias bandas na eletroforese (Figuras 5 e 6), mostrando a existência de várias proteínas que não apenas as proteínas virais. Uma dessas prováveis proteínas seria a albumina sérica bovina, presente no soro fetal bovino usado para suplementar os meios L-15-C e L-15-MAN, e que poderia estar em grande quantidade no sedimento obtido durante a concentração do vírus (item 3.5).

Assim, havia a possibilidade do ENAGIS-MAY apresentar um resultado inespecífico devido à reação entre albumina bovina e anticorpos antialbumina bovina presentes nas amostras de sangue dos animais do grupo M, uma vez que a amostra usada para infectar esses animais era oriunda do sobrenadante da cultura de células VERO infectadas com MAYV, o qual também continha a albumina sérica bovina. Para avaliar a presença destes possíveis resultados foi acoplado ao látex BSA fração V (Reagen[®]), conforme descrito no item 3.12.3.

Os dados apresentados na Tabela 5 indicam que entre os animais do grupo C a reação foi negativa, não sendo portanto detectada a presença de anticorpos antialbumina bovina. Já entre os animais do grupo M, a amostra M2 apresentou reação negativa. As amostras M1, M3 e M4 apresentaram títulos de 10.

Tabela 5 – Resultado das reações de aglutinação entre látex contendo albumina sérica bovina e as amostras de sangue dos animais dos grupos C e M, aplicadas em discos de papel de filtro e eluídas com tampão borato 0,2M pH 8,5, após 5 min de agitação a 180 rpm.

Animais	Amostra não diluída ^a	Amostras diluídas ^b	
		1:10	1:50
M1	+	+	-
M2	-	NT	NT
M3	+	+	-
M4	+	+	-
C1	-	NT	NT
C2	-	NT	NT
C3	-	NT	NT
C4	-	NT	NT

+ reação positiva para anticorpos antialbumina bovina.

- reação negativa.

a – 10µL do eluído.

b – amostras eluídas e diluídas em tampão borato 0,2M pH 8,5.

NT – não testado.

M1 a M4 – camundongos infectados com MAYV.

C1 a C4 – camundongos que receberam PBS pH 7,2.

Os resultados apresentados pela reação das amostras dos grupos C e M com o LPCM-MAY e com o LPCM-BSA sugerem que títulos menores de 50 seriam considerados negativos para anticorpos contra MAYV, uma vez que títulos menores de 50 foram encontrados para anticorpos contra BSA, no modelo experimental usado.

No entanto, para nossa proposta de utilização do ENAGIS-MAY na detecção de anticorpos antimayaro em humanos, o fato ocorrido no modelo experimental não seria responsável por reações inespecíficas, uma vez que anticorpos antialbumina não são encontrados em condições naturais em um indivíduo.

Além disso, segundo a literatura, a presença de BSA acoplada ao látex inicialmente não poderia ser considerada como um fator de indução de

resultados inespecíficos, uma vez que é recomendado seu uso como agente bloqueador das regiões do látex que não foram acopladas com proteínas (BÜSCHER *et al.*, 1991; LEJON *et al.*, 1998; BÜSCHER *et al.*, 1999).

Embora no modelo experimental usado houve a detecção de anticorpos antialbumina nas amostras de sangue dos animais do grupo M, estes apresentaram títulos de anticorpos antimayaro maiores ou iguais a 50 com ENAGIS-MAY, indicando que os animais produziram mais anticorpos contra as proteínas do MAYV. Assim sendo, esses possíveis resultados inespecíficos encontrados pelo LPCM-BSA não prejudicam a proposta de utilização do ENAGIS-MAY, e nem invalidam o modelo experimental usado.

Portanto, o ENAGIS-MAY foi capaz de detectar anticorpos antimayaro no sangue de animais do ensaio biológico infectados com MAYV impregnadas em papel de filtro.

4.8. Ensaio de neutralização de placa em microcultura das amostras de soro obtidas no ensaio biológico

O ensaio de neutralização de placa é um método altamente sensível para detecção e quantificação de anticorpos virais. Sua grande especificidade o credencia como padrão-ouro quando outros procedimentos sorológicos estão sendo avaliados (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998a). Seawright *et al.* (1974) propuseram uma variação da técnica inicialmente descrita por Porterfield (1964), utilizando a técnica de neutralização de placas em microcultura de células em placas de 24 poços.

Esta técnica baseia-se na determinação do título de anticorpos capazes de reduzir em 50% a presença de placas de lise virais em culturas de células infectadas (CED₅₀). No presente trabalho, essa técnica foi utilizada para detectar a presença de anticorpos contra MAYV nas amostras do ensaio biológico.

As placas de lise de cada diluição foram contadas e os cálculos realizados para determinação do CED₅₀ (Apêndice 3).

Conforme a Tabela 6, o CED_{50} das amostras do grupo M foi 13, 29, 23 e 20 para M1, M2, M3 e M4, respectivamente. As amostras do grupo C apresentaram valores menores de CED_{50} : 9, 10, 6 e 7 para C1, C2, C3 e C4, respectivamente.

Tabela 6 – Valores de CED_{50} calculados para as amostras dos grupos C e M

Animal	CED_{50}
M1	13
M2	29
M3	23
M4	20
C1	9
C2	10
C3	6
C4	7

M1 a M4 – camundongos infectados com MAYV.

C1 a C4 – camundongos que receberam PBS pH 7,2.

De acordo com esses dados pôde-se inferir que as amostras do grupo C apresentaram anticorpos inespecíficos que foram capazes de neutralizar o MAYV, diminuindo assim o número de placas de lise na cultura de células. No entanto, as amostras do grupo infectado apresentaram títulos maiores do que o maior título do grupo controle.

Na análise estatística para verificar a significância dos valores de CED_{50} encontrados para cada grupo, utilizou-se o teste de Mann-Whitney, sendo o valor de p considerado significativo ($p=0,028$), ou seja, há diferença estatística significativa entre os grupos M e C. De acordo com os cálculos do intervalo de confiança para as amostras do grupo M (I.C. 95% ; 10,67-31,83) e do grupo C (I.C. 95% ; 5,10-10,90), valores de CED_{50} maiores do que 10 foram considerados positivos para a presença de anticorpos específicos contra MAYV e valores menores ou iguais a 10 foram considerados negativos para anticorpos antimayaro.

4.9. Determinação da sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY

A sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY foram calculadas utilizando como padrão-ouro o ENPM (Apêndice 4). Na Tabela 7 encontram-se os resultados encontrados para ENAGIS-MAY e ENPM. Utilizando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc) calculou-se também os intervalos de confiança.

Tabela 7 – Resultados da detecção de anticorpos antimayaro nas amostras do ensaio biológico pelo ENAGIS-MAY e ENPM.

Amostra	ENAGIS-MAY ^a	ENPM ^b
M1	+ (50)	+ (13)
M2	+ (100)	+ (29)
M3	+ (50)	+ (23)
M4	+ (50)	+ (20)
C1	- (0)	- (9)
C2	- (0)	- (10)
C3	- (0)	- (6)
C4	- (0)	- (7)

a – Os títulos encontram-se entre parêntesis. Amostras com títulos maiores que 50 foram consideradas positivas para anticorpos antimayaro.

b – Os valores de CED₅₀ encontram-se entre parêntesis. As amostras com CED₅₀ maiores que 10 foram consideradas positivas para anticorpos antimayaro.

M1 a M4 – camundongos infectados com MAYV.

C1 a C4 – camundongos que receberam PBS pH 7,2.

A sensibilidade (95% I.C.) do ENAGIS-MAY foi 100% (39,8-100,0%) e a especificidade (95% I.C.) também foi 100% (39,8-100,0%). Esses dados comprovam a eficiência do ENAGIS-MAY em detectar anticorpos contra MAYV nas amostras do ensaio biológico, utilizando como ensaio padrão o ENPM. Apesar do intervalo de confiança calculado ter sido amplo, observou-se associação estatisticamente significativa ($p=0,029$) entre os resultados apresentados pelo ENAGIS-MAY e pelo ENPM usando o teste de Fisher

bilateral. Desse modo, os resultados apresentados pelo ENAGIS-MAY são coerentes com os resultados apresentados pelo teste padrão, ou seja, os resultados positivos e negativos identificados pelo ENAGIS-MAY estão de acordo com os resultados apresentados pelo ENPM. Porém, estes resultados devem ser analisados com cautela, uma vez que a população analisada foi pequena ($n = 8$). Estudos com um número maior de amostras tornam-se necessários a fim de avaliar melhor a metodologia proposta. Também é necessária a realização de estudos em amostras de sangue humano para confirmar a capacidade de detecção de anticorpos antimayaro pelo ENAGIS-MAY. A partir desses estudos pode-se definir com precisão a sensibilidade e especificidade do teste. Contudo, os resultados aqui apresentados demonstram, a princípio, que o ENAGIS-MAY poderia ser usado como teste para detecção de anticorpos contra o MAYV em amostras de sangue impregnadas em papel de filtro.

Para avaliar a capacidade diagnóstica do ENAGIS-MAY estudos devem ser realizados com amostras coletadas em intervalos de 15 dias (sorologia pareada). Somente com a verificação do aumento do título de anticorpos entre as amostras seria possível fazer um diagnóstico utilizando-se o ENAGIS-MAY. Vale ressaltar que a sintomatologia do paciente também deve ser considerada para se fazer um diagnóstico preciso da febre Mayaro (CALISHER *et al.*, 1986).

Outra questão que deve ser avaliada em estudos futuros é a reação cruzada do ENAGIS-MAY com outros arbovírus. Chanas *et al.* (1976) já haviam identificado reações cruzadas entre alfavírus usando ensaio de neutralização de placa em microcultura celular. Segundo os autores, as reações cruzadas foram comuns, mas restritas dentro dos complexos do *Western equine encephalitis virus* (WEEV) e do *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). Corroborando esses dados, Calisher *et al.* (1986) observaram reatividade cruzada de IgM entre alfavírus pertencentes aos complexos antigênicos WEEV e SFV, provavelmente devido à resposta às glicoproteínas do envelope, tanto no ELISA como em testes de IH e neutralização. Com a evolução da resposta imunológica, os anticorpos IgG passam a ser os responsáveis pela reatividade cruzada.

Dois trabalhos demonstram a padronização de ensaios utilizando partículas virais inteiras, como proposto no ENAGIS-MAY. Figueiredo *et al.* (1989) padronizaram uma técnica de MAC-ELISA para detecção de anticorpos IgM antimayaro, concluindo que a técnica foi válida para o diagnóstico de infecções recentes causadas pelo vírus. Outra técnica de MAC-ELISA também já havia sido descrita por Calisher *et al.* (1986) como sendo útil no diagnóstico individual e em estudos epidemiológicos de infecções pelo MAYV.

De acordo com esses dados, é viável a padronização de um ensaio de detecção de anticorpos contra MAYV utilizando partículas inteiras do vírus. No entanto, é desejável utilizar proteínas recombinantes do vírus através de técnicas de clonagem e expressão de proteínas, uma vez que o emprego de seqüências de aminoácidos específicas do MAYV aumentaria a sensibilidade e especificidade do ensaio, além de diminuir os custos e o tempo de produção do ensaio, como demonstrado por Francis *et al.* (1988) na padronização de um ensaio de aglutinação utilizando proteínas recombinantes do HIV.

Em geral, as reações de aglutinação indireta para o diagnóstico de doenças são realizadas em amostras de soro, ou seja, é necessário coletar o sangue do indivíduo, esperar a sua coagulação, e em seguida, centrifugá-lo a fim de separar o soro. Este processo envolve o uso de equipamentos (centrífuga, pipetas, tubos de ensaio) além de expor o técnico ou o laboratorista a risco de contágio, pois este manipula algumas vezes a amostra biológica. A realização de ensaios de aglutinação indireta em amostras de sangue total não apresenta os inconvenientes citados anteriormente, além de ser menos invasiva, pois o teste requer apenas uma gota de sangue do paciente.

O método de acoplamento químico de proteínas a partículas de látex de poliestireno modificadas contendo grupos carboxila padronizada neste trabalho demonstrou ser simples, prática, barata e de fácil execução. Além disso, o acoplamento de diferentes proteínas (virais e albumina sérica bovina) permitiu padronizar dois ensaios para detecção de anticorpos diferentes, evidenciando a versatilidade da técnica e a possibilidade de

utilizá-la para padronização de ensaios para detecção de diferentes anticorpos.

O Brasil apresenta panorama muito favorável para o desenvolvimento de epidemias de arbovírus, qual seja, grandes áreas cobertas por florestas, próximas a cidades densamente povoadas e infestadas de mosquitos (FIGUEIREDO, 2007). A urbanização descontrolada e o desmatamento, aliados às baixas condições de saneamento básico da população, contribuem para a adaptação dos arbovírus a novos ciclos de manutenção (GUBLER, 1996; 1998). O risco de arboviroses, como a febre Mayaro é cada vez maior, e vários surtos da doença já foram identificados na região amazônica, e em Estados vizinhos (HOCH *et al.*, 1981; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1989; PINHEIRO e LeDUC, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 1998; 2001). A possibilidade do vírus Mayaro ser transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* (ANDERSON *et al.*, 1957) e a ocorrência de surtos simultâneos com a febre amarela (PINHEIRO *et al.*, 1978) são fatos importantes que classificam o MAYV como importante arbovírus em nosso país, não devendo ser subestimado pelos setores responsáveis pela políticas públicas de saúde no Brasil.

Com a disponibilização do ensaio de aglutinação indireta a partir do sangue total para a detecção de anticorpos contra o MAYV (ENAGIS-MAY) conseguir-se-á um grande avanço no diagnóstico diferencial entre febre Mayaro, dengue e febre amarela, as principais arboviroses do país, melhorando o tratamento e o prognóstico de pacientes infectados. Isso resultará em maiores índices de cura, menores gastos com internações e medicamentos, e um avanço considerável na qualidade dos serviços públicos de assistência à saúde no Brasil.

5. CONCLUSÕES

- O ENAGIS-MAY foi padronizado, sendo capaz de detectar em papel de filtro anticorpos antimayaro presentes em amostras de sangue contendo anticorpos antimayaro e hemácias humanas.
- ENAGIS-MAY detectou anticorpos antimayaro em amostras de sangue de camundongos infectados com MAYV e impregnadas em papel de filtro.
- A sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY foi 100%, utilizando o ensaio de neutralização de placa em microcultura como padrão-ouro na determinação de anticorpos antimayaro.
- Constatou-se associação estatisticamente significativa, pelo teste de Fisher bilateral, entre o ENAGIS-MAY e ENPM na detecção de anticorpos antimayaro.

6. REFERÊNCIAS

- AIKEN, T.H.G., DOWNS, W.G., ANDERSON, C.R. *et al.* I. *Mayaro virus* isolated from a Trinidad mosquito (*Mansonia venezuelensis*). **Science**, v.131, p.986, 1960.
- ANDERSON, C.R., DOWNS, W.G., WATTLE, G.H. *et al.* *Mayaro virus* : A new human disease agent.II. Isolation from blood of patient in Trinidad, B.W.I. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.6, p.1012-1016, 1957.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.7, p.93-99, 1987.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.245-248, 1976.
- BRONZONIA, R.V.M., MORELIA, M.L., CRUZ, A.C.R. *et al.* Multiplex nested PCR for Brazilian *Alphavirus* diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.456-461, 2004.
- BÜSCHER, P., DRAELANTS, E., MAGNUS, E., *et al.* An experimental latex agglutination test for antibody detection in human African trypanosomiasis. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v.71, p.267-273, 1991.
- BÜSCHER, P., LEJON, V., MAGNUS, E., *et al.* Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. **Acta Tropica**, v.73, p.11-20, 1999.
- CALISHER, C.H., GUTIERREZ, E., MANESS, K.S. *et al.* Isolation of *Mayaro virus* from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, p.243-248, 1974.
- CALISHER, C.H., SHOPE, R.E., BRANDT, W. *et al.* Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togaviridae*, *Alphavirus*. **Intervirology**, v.14, p.229-932, 1980.
- CALISHER, C.H., EL-KAFRAWI, A.O., AL-DEEN MAHMUD, M.I. *et al.* Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses . **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p.155-159, 1986.

CAUSEY, O.R. and MAROJA, O.M. *Mayaro virus* a new human disease agent III: investigation of an epidemic of acute febrile illness on the River Gramá in Pará, Brazil and isolation of *Mayaro virus* as a causative agent. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p.1017–1023, 1957.

CHANAS, A.C., JOHNSON, B.K., SIMPSON, D.I.H. Antigenic Relationships of Alphaviruses by a Simple Micro-culture Cross-neutralization Method. **The Journal of General Virology**, v. 32, p. 295-300, 1976.

CHAPPUIS, F., PITTET, A., BOVIER, P.A., *et al.* Field evaluation of the CATT/*Trypanosoma brucei gambiense* on blood-impregnated filter papers for diagnosis of human African trypanosomiasis in southern Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, p. 942–948, 2002.

CHIPPAUX, A. Généralités sur arbovirus et arboviroses: Overview of arbovirus and arboviroses. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 33, p.377–384, 2003.

CHENG, R.H., KUHN, R.J., OLSON, N.H. *et al.* Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. **Cell**, v. 80, p. 621-630, 1995.

COIMBRA, T.L.M., SANTOS, C.L.S., SUZUKI, A. *et al.* *Mayaro virus*: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 221-224, 2007.

DELMONT, J. Aspects cliniques et biologiques des arboviroses: Clinical and biological aspects of arbovirus diseases. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 33, p.545–548, 2003.

DE THOISY, B., GARDON, J., SALAS, R.A., *et al.* *Mayaro virus* in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, 2003. Disponível em <<http://www.cdc.gov/eid>>. Acesso em: 16/09/2006.

DULBECCO, R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.38, p.747–752, 1952.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. **Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2nd edition. San Diego: Academic Press, 1162p, 2005.

FERREIRA, D.F. and REBELLO, M.C.S. Interferon selectively inhibits the synthesis of *Mayaro virus* glycoproteins . **Revista de Microbiologia**, v. 29, 1998. Disponível em <[http:// www.scielo.com](http://www.scielo.com)>. Acesso em: 25/09/2006.

FERREIRA, D.F., SANTO, M.P.E., REBELLO, *et al.* Weak bases affect late stages of Mayaro vírus replication cycle in vertebrate cells. **Journal Medical Microbiology**, v. 49, p. 313-318, 2000.

FERREIRA, A.W. e ÁVILA, S.L.M. Sorologia: Importância e Parâmetros In: FERREIRA, A. W., ÁVILA, S.L.M.. **Diagnóstico Laboratorial**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1-9, 2001.

FIGUEIREDO, L.T.M, NOGUEIRA, R.M.R, CAVALCANTI, S.M.B *et al.* Study of two different enzyme immunoassays for the detection of *Mayaro virus* antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p.303-307, 1989.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, R.M. P.D., THATCHER, B.D., LIMA, M.L. *et al.* Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998 e 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 476-479, 2004.

FRANCIS, H.L., KABEYA, M., KAFUAMA, N. *et al.* Comparison of sensitivities and specificities of latex agglutination and an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to the *Human immunodeficiency virus* in Africa sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p.2462-2464, 1988.

FREITAS, M.S., DA POIAN, A.T., BARTH, O.M *et al.* The fusogenic state of *Mayaro virus* induced by low pH and by hydrostatic pressure. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p.325-335, 2006.

GASPAR, L.P., TEREZAN, A.F., PINHEIRO, A.S. *et al.* The metastable state of nucleocapsids of enveloped viruses as probed by high hydrostatic pressure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.7415–7421, 2001.

GEIGENMULLER-GNIRKE, U., NITSCHKO, H. and SCHLESINGER, S. Deletion analysis of the capsid protein of *Sindbis virus*: identification of the RNA binding region. **Journal of Virology**, v. 67, p.1620-1626, 1993.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p.330–342, 2002.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480–496, 1998.

GUBLER, D.J. The global resurgence of arboviral diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 449–451, 1996.

HELENIUS, A. and KARTENBECK, J. The effects of octylglucoside on the *Semliki forest virus* membrane. **European Journal of Biochemistry**, v. 106, p.613-618, 1980.

HOCH A.L., PETERSON N.E., Le DUC J.N. *et al.* An outbreak of *Mayaro virus* disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 689–698, 1981.

HOLLAND, W.G., THANH, N.G., MY, L.N., *et al.* Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. **Acta Tropica**, v. 81, p.159–165, 2002.

HUANG, C.Y.H., BUTRAPET, S., PIERRO, D.J. *et al.* Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53) / dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. **Journal of Virology**, v.74, p. 3020–3028, 2000.

SHIMARU, D., MARCICANO, F.G.P. and REBELLO, M.A. Inhibition of *Mayaro virus* replication by prostaglandin A1 and B2 in Vero cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p.1119-1123, 1998.

JAMONNEAU, V., TRUC, P., GARCIA, A., *et al.* Preliminary evaluation of LATEX:*T. b. gambiense* and alternative versions of CATT:*T. b. gambiense* for the serodiagnosis of Human african trypanosomiasis of a population at risk in Côte d'Ivoire: considerations for mass-screening. **Acta Tropica**, v. 76, p. 175–183, 2000.

JUNT, T., HERAUD, J.M., LELARGE, J., *et al.* Determination of natural versus laboratory human infection with *Mayaro virus* by molecular analysis. **Epidemiology and Infection**, v. 123, p. 511-513, 1999.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, San Antonio, TX, USA, 3 ed., 1985.

KARABATSOS, N. **2000 Annual report on the catalogue of arthropod-borne and selected vertebrate viruses of the world**. CDC Fort Collins. 2002.

LAVERGNE , A., DE THOISY, B., LACOSTE, V., *et al.* *Mayaro virus*: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus Research**, v.117, p. 283–290, 2006.

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

LEJON, V., BÜSCHER, P., SEMA, N.H., *et al.* Human african trypanosomiasis: a latex agglutination field test for quantifying IgM in cerebrospinal fluid. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, p.553-558, 1998.

METSELAAR D. Isolation of arboviruses of group A and group C in Suriname. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 18, p.137-42, 1966.

MEZENCIO, J. M. S., REBELLO, M.A. *Mayaro virus* proteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 299-304, 1993.

MEZENCIO, J.M.S., SOUZA, W., FONSECA, M.E.F., *et al.* Ultrastructural study of *Mayaro virus* replication in BHK-21 cells. **Archives of Virology**, v. 114, p.229-235, 1990.

MEZENCIO, J.M.S., SOUZA, W., FONSECA, M.E.F. *et al.* Replication of *Mayaro virus* in *Aedes albopictus* cells: an electron microscopic study. **Archives of Virology**, v. 104, p.299-308, 1989.

MICHEL, M.R., FAVRE, D., STUDER, E., *et al.* Modulation of thermoprotection and translational thermotolerance induced by *Semliki Forest virus* capsid protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, p. 791-797, 1994.

MITCHELL, C. ANDRADE-ROZENTAL, A.F., SOUTO-PADRÓN, T., *et al.* Identification of *Mayaro virus* nucleocapsid protein in nucleus of *Aedes albopictus* cells. **Virus Research**, v. 47, p. 67-77, 1997.

NAKAJIMA, N. and IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, p.123-130, 1995.

NAVARRETE-ESPINOSA, J. E GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 44, p. 347-353, 2006.

NEEL, J.V., ANDRADE, A.H.P., BROWN, G.E. *et al.* Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, p. 486-498, 1968.

NOIREAU, F., FORCE-BARGE, P., CATTAND, P. Evaluation of Testryp CATT applied to samples of dried blood for the diagnosis of sleeping sickness. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 69, p.603-608, 1991

PENCHENIER, L., GRÉBAUT, P., NJOKOU, F., *et al.* Evaluation of LATEX/*T.b.gambiense* for mass screening of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Central Africa. **Acta Tropica**, v. 85, p.31-37, 2003

PINHEIRO, F.P., FREITAS, R.B., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. *et al.* An outbreak of *Mayaro virus* disease in Belterra, Brazil. Clinical and virological findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p.674-681, 1981.

PINHEIRO F.P. e LeDUC J.W. *Mayaro virus* disease. In: MONATH T.P. editor. **The arboviruses: epidemiology and ecology**, v. 3. Boca Raton (FL): CRC Press; p 137–50, 1998.

PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA J.F.S. *et al.* Epidemias simultâneas de Mayaro e febre amarela em Belterra, Pará. **Boletim Epidemiológico / MS**, v. 10, p.146-52, 1978.

PORTERFIELD, J. A. The plaque inhibition test. In ACKROYD, J.F. (ed.). **Immunological Methods**. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 341-362, 1964.

PORTERFIELD J.S. Comparative and historical aspects of the Togaviridae and Flaviviridae. In: SCHLESINGER S., SCHLESINGER M.J. (eds). **The Togaviridae and Flaviviridae**. New York: Plenum Press, p.1–19, 1986.

POWERS, A.M., BRAULT, A.C., SHIRAKO, Y., *et al.* Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, p. 10118–10131, 2001.

POWERS, A.M., AGUILAR, P.V., CHANDLER, L.J., *et al.* Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 461–469, 2006.

ROSAS, S.L.B., HERCULANO, S., CARVALHO, M.G.C. Distribution of *Mayaro virus* RNA in polysomes during heat shock. **Virus Research**, v. 48, p. 133–141, 1997.

SANCHEZ, M.C.A. Testes Sorológicos. In: FERREIRA, A. W., ÁVILA, S.L.M.. **Diagnóstico Laboratorial**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.10-48, 2001.

SCHLESINGER, S. and SCHLESINGER, M.J. *Togaviridae*: the viruses and their replication. In KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (eds.). **Fields Virology**. 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap.29, 2001.

SEAWRIGHT, G.L., HARDING, G., THOMAS, F.C. *et al.* Microculture plaque neutralization test for California group arboviruses. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 802-806, 1974.

SMITH, G. C. and FRANCY, D. B, Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, p. 89–93, 1991.

STRAUSS, J.H. and STRAUSS, E.G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiology Reviews**, v. 58, p. 491–562, 1994.

TALARMIN, A., CHANDLER, L.J., KAZANJI, M., *et al.* Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification and seroprevalence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p. 452–456, 1998.

TAYLOR, S.F., PATEL, P.R., HEROLD, T.J.S. Recurrent arthralgias in a patient with previous Mayaro fever infection. **Southern Medical Journal**, v. 98, p. 484–485, 2005.

TESH, R.B., WATTS, D.M., RUSSELL, K.L., *et al.* Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical Infectious Disease**, v. 28, p.67–73, 1999.

TORRES, J.R., RUSSELL, K.L., VASQUEZ, C., *et al.* Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, 2004. Disponível em <<http://www.cdc.gov/eid>>. Acesso em: 19/09/2006.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., SHAPE, R.E., PINHEIRO, F.P. *et al.* Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: UREN, M.F., BLOK, J. and MANDERSON, L.H. **Arbovirus Research In Australia - Proceedings Fifth Symposium**. CSIRO Tropical Animal Science. Brisbane, p. 4–8, 1989.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. *et al.* **Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudos**. Documento técnico nº 2. Instituto Evandro Chagas Fundação Nacional de Saúde; Belém. 46p, 1998a.

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., *et al.* Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 19–31, 1998b.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Introduction to the species concept in virus taxonomy. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOGH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. (Eds.). **Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press Inc., San Diego, CA. 2000.

VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS A.P.A., RODRIGUES S.G., *et al.* Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arbovirus. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p.155–64, 2001.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P. *et al.* Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. and TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., ed. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p. 72-99, 1998.

VERLOO, D., HOLLAND, W., MY, L.N., *et al.* Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 87–96, 2000.

VERLOO, D., LEJON, V., TIBAYRENC, R., *et al.* Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* infections in camels from Niger. **Journal of Protozoology Research**, v.8, p.190–193, 1998.

VIRGILIO, P.L., GODINHO-NETTO, M.C.M., CARVALHO, M.G.C. Previous heat shock treatment inhibits *Mayaro virus* replication in human lung adenocarcinoma (A549) cells. **Research in Virology**, v. 148, p. 333-342, 1997.

XINGLIN, J., HUANCHUN, C., QIGAI, H., *et al.* The Development and Application of the Latex Agglutination Test to Detect Serum Antibodies against Japanese Encephalitis Virus. **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 495-503, 2002.

WATTS, D.M. Mayaro fever. In: STRICKLAND G.T. editor. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**. 8th ed. Philadelphia (PA): W.B. Saunders Co., p. 251–252, 2000.

WEAVER, S.C. e BARRETT, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 789-801, 2004.

7. APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Gráfico e tabela utilizados para cálculos das massas moleculares relativas das proteínas virais.

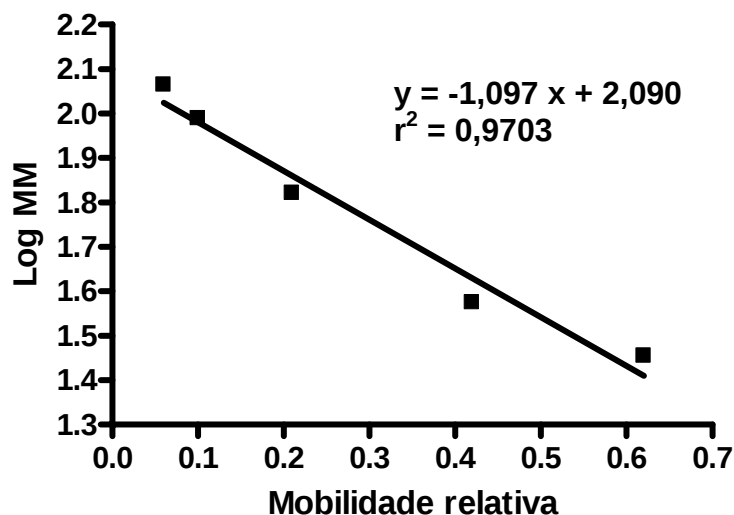


Figura 1 – Gráfico obtido pela regressão linear da curva padrão correlacionando-se a mobilidade relativa das proteínas do padrão de massa molecular com o logaritmo da massa molecular. Marcadores de massa molecular utilizados: galactosidase (116,0 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), álcool desidrogenase (37,6 kDa) e anidrase carbônica (28,5 kDa).

Tabela 1 – Mobilidade relativa das bandas encontradas nas frações MB1, MB2, MPEL e ML2 submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) corado pela prata.

Bandas	Mobilidade relativa
1	0,51
2	0,36
3	0,33
4	0,23
5	0,09

APÊNDICE 2 – Tabela utilizada para determinação do título do estoque viral padrão.

Tabela 2 – Contagem das placas de lise observadas em cultura de células VERO após infecção utilizando diferentes diluições do vírus Mayaro para determinação do título viral segundo método de contagem de placas de Dulbecco.

Cultura celular	Diluição do vírus Mayaro ^a				Controle ^b
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
garrafa 1	122	54	6	2	0
garrafa 2	150	60	5	0	2
garrafa 3	144	49	8	3	2

a – vírus Mayaro do estoque padrão diluído em meio L-15-MAN.

b – garrafa contendo apenas meio L-15-MAN.

Os valores representam o número de placas de lise contadas 48h p.i..

APÊNDICE 3 – Tabelas utilizadas para determinação do CED₅₀ das amostras do ensaio biológico

Tabela 3 – ENPM com contagem das placas de lise em culturas de células VERO infectadas com MAYV (2 x 10⁶ PFU) previamente incubado com diluições do soro dos animais do ensaio biológico.

Animais	Diluição ^a	Nº placas contadas		Média ^b
M1	1	nc	19	17
M1	1:2	15	25	20
M1	1:4	23	nc	23
M1	1:8	nc	nc	-
M1	1:16	26	30	28
M1	1:32	33	36	34
M2	1	nc	nc	-
M2	1:2	7	11	9
M2	1:4	10	12	11
M2	1:8	16	14	15
M2	1:16	18	22	20
M2	1:32	nc	26	26
M3	1	nc	8	8
M3	1:2	11	10	10
M3	1:4	14	12	13
M3	1:8	nc	16	16
M3	1:16	nc	24	24
M3	1:32	nc	30	30
M4	1	6	nc	6
M4	1:2	nc	nc	-
M4	1:4	8	nc	8
M4	1:8	11	nc	11
M4	1:16	21	nc	21
M4	1:32	nc	nc	-

C1	1	19	nc	19
C1	1:2	nc	nc	-
C1	1:4	nc	nc	-
C1	1:8	22	30	26
C1	1:16	27	35	31
C1	1:32	30	42	36
C2	1	1	0	1
C2	1:2	9	11	10
C2	1:4	13	17	15
C2	1:8	27	25	26
C2	1:16	36	30	33
C2	1:32	nc	nc	-
C3	1	14	8	11
C3	1:2	nc	nc	-
C3	1:4	25	23	24
C3	1:8	33	37	35
C3	1:16	40	48	44
C3	1:32	nc	nc	-
C4	1	11	13	12
C4	1:2	18	16	17
C4	1:4	nc	23	23
C4	1:8	30	nc	30
C4	1:16	nc	38	38
C4	1:32	nc	nc	-

a – As amostras de soro foram diluídas em meio L-15-MAN.

b – Média aritmética das contagens das placas de lise de cada diluição. Quando existiu apenas um valor de contagem de placa, este foi considerado o valor médio para calcular o CED₅₀.

nc – não foi possível fazer a contagem das placas,

M1 a M4 – camundongos infectados com MAYV,

C1 a C4 – camundongos inoculados com PBS pH 7,2.

Tabela 4 – Equações da reta calculadas para cada amostra do ensaio biológico obtidas a partir dos valores do arco seno da raiz quadrada do percentual de sobrevivência de cada diluição (eixo das ordenadas) e do fator de diluição (eixo das abscissas).

Animal	Equação da reta	Valor de r^2	CED ₅₀ ^a
M1	$y = 0,57x + 37,41$	0,9319	13
M2	$y = 0,66x + 25,79$	0,9501	29
M3	$y = 0,83x + 25,80$	0,9331	23
M4	$y = 1,31x + 18,41$	0,9938	20
C1	$y = 0,62x + 39,18$	0,9303	9
C2	$y = 1,91x + 25,31$	0,9206	10
C3	$y = 2,54x + 30,45$	0,9203	6
C4	$y = 1,92x + 31,43$	0,9298	7

M1 a M4 – camundongos infectados com MAYV.

C1 a C4 – camundongos inoculados com PBS pH 7,2.

a – Valores calculados substituindo-se y de cada equação por 45, equivalente a raiz quadrada do arco seno de 0,5 (título anticorpos capaz de reduzir 50% das placas de lise).

APÊNDICE 4 – Tabela e quadro utilizados para determinação da sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY.

Tabela 5 – Resultados da pesquisa de anticorpos antimayaro nas amostras do ensaio biológico utilizados para os cálculos de sensibilidade e especificidade do ENAGIS-MAY.

ENAGIS-MAY	ENPM ^a	
	positivos ^b	negativos ^c
positivos ^b	4	0
negativos ^c	0	4
Total	4	4

a – Ensaio de Neutralização de Placa em Microcultura.

b – animais que apresentaram anticorpos antimayaro.

c – animais que não apresentaram anticorpos antimayaro.

Quadro 1 – Equações utilizadas para cálculos da sensibilidade e especificidade.

Sensibilidade	$\frac{100 \times VP}{VP + FN}$
Especificidade	$\frac{100 \times VN}{VN + FP}$

VP = verdadeiros positivos.

FN = falsos negativos.

VN = verdadeiros negativos.

FP = falsos positivos.

(FERREIRA e ÁVILA, 2001).