

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Produção de antígenos virais para os sorotipos DEN-1, DEN-2,
DEN-3 e DEN-4 do vírus da Dengue**

Renata Costa de Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
a obtenção de grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Julho – 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Produção de antígenos virais para os sorotipos DEN-1, DEN-2,
DEN-3 e DEN-4 do vírus da Dengue**

Renata Costa de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
a obtenção de grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Julho – 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Produção de antígenos virais para os sorotipos DEN-1, DEN-2,
DEN-3 e DEN-4 do vírus da Dengue**

Renata Costa de Oliveira

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 13/07/2005. Nota 100,00

Celia Maria
Prof. Dr.^a Celia Maria
Instituto de Biologia

Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Prof.^a Dr.^a Divina Aparecida Oliveira Queiróz

Leonilda Stanziola Knychala

Prof. Dr.^a Leonilda Stanziola Knychala

Lourenço Faria Costa

Lourenço Faria Costa

Uberlândia, 13 de julho de 2005

Ofereço

A Deus por me abençoar com mais este presente e aos meus pais Dalmo e Áurea, que sempre estiveram ao "meu lado" durante minha graduação, ajudando-me de todas as formas para que esse sonho pudesse ser realizado.

Agradecimentos

À DEUS por cuidar de mim e ser o meu melhor amigo

Agradeço especialmente à minha orientadora, Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz, pela oportunidade, dedicação, carinho e encaminhamento na pesquisa.

Aos meus pais, meus irmãos e à minha sobrinha, pela ajuda nos momentos em que mais necessitei e por seu grande amor por mim.

À Lysa Nepomuceno por ter me ensinado a técnica Imunofluorescência Indireta e por ter realizado todas as leituras destas reações.

Ao Cláudio Carvalho por ter me ensinado o isolamento viral e por me auxiliar na implantação da cultura de células C6/36.

Aos amigos Guilherme, Bruno e Ludmila pelo auxílio na execução de algumas atividades laboratoriais e pela amizade.

Ao Lourenço Faria Costa por sua grande contribuição na minha formação profissional e por sua amizade.

À Thelma Mattos de Oliveira por sua ajuda na elaboração da monografia e por sua amizade e carinho.

Ao Dr. Jonny Yokosawa por de alguma maneira contribuir para a minha formação.

Aos amigos Gabriela Dyonísio, Livia Rossi e Lucas Zimon por sua amizade.

A todos os meus amigos e parentes pela amizade, carinho e compreensão.

Ao Instituto Evandro Chagas por contribuir com materiais para realização deste trabalho.

Ao Laboratório Central da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás pela oportunidade de treinamento e por contribuir com materiais de consumo para realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia e Parasitologia pelos equipamentos cedidos.

Aos grandes amigos, Luciana Karem, Thiago Augusto e Cibele Lima que me ajudaram durante a graduação e a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal.

Resumo

A dengue constitui um sério problema de saúde pública sendo a mais importante arbovirose que afeta o homem, nos países de clima tropical. Esta doença pode provocar desde sintomas brandos-Dengue clássica a manifestações clínicas severas, como a febre hemorrágica e a síndrome de choque por dengue. Em decorrência da relevância clínica e epidemiológica que a Dengue apresenta, é necessário um diagnóstico adequado, sendo a técnica de isolamento viral em cultura de células imprescindível para o diagnóstico/pesquisa em Dengue. Nesse sentido, propõe-se para esse estudo a produção de antígenos virais para os sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 em cultura de células C6/36, provenientes de mosquito *Aedes albopictus*, utilizando a reação imunofluorescência indireta (IFI) para a confirmação do “crescimento viral” de cada um dos sorotipos mencionados. A implantação da linhagem celular referida anteriormente, foi bem sucedida, apesar de algumas dificuldades encontradas. O número de dias para a observação do efeito citopático após o inoculo foi semelhante para os quatro sorotipos, variando de 3 a 4 dias. Todos os isolados foram confirmados pela IFI, utilizando-se anticorpos policlonais. O isolamento viral se mostrou fundamental não apenas em termos de diagnóstico mas também no que diz respeito à contribuição para a produção de antígenos virais. Entretanto, a futura utilização de anticorpos monoclonais na reação de IFI, poderá confirmar o sorotipo isolado contribuindo assim, para elucidar ainda mais as questões de cunho epidemiológico da Dengue nessa região.

Índice

1 – INTRODUÇÃO	01
2 – MATERIAL E METODOS.	04
2.1. Implantação e manutenção da linhagem de células C6/36	04
2.2. Estudo piloto para padronização da técnica da produção dos antígenos virais.	04
2.3. Reação de imunofluorescência indireta (IFI) (Fluxograma 1)	08
2.4 - Produção dos antígenos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Fluxograma 2 e 3) .	09
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.	16
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	17

1. Introdução

A dengue constitui um sério problema de saúde pública no mundo, sendo a mais importante arbovirose que afeta o homem, principalmente nos países tropicais onde as condições de clima quente e úmido favorecem a disseminação do vírus (MS FNS/ CNE, 1998; Gubler, 1989). A doença também contribui para problemas de caráter sócio-econômicos, já que os principais surtos epidêmicos ocorrem em países que estão em desenvolvimento, e como tal, os impactos econômicos decorrentes da dengue são relevantes para a economia desses países (GUBLER, 2002).

O vírus da dengue é transmitido pela fêmea do mosquito *Aedes sp.*, onde o principal vetor urbano é o *Aedes aegypti*, que põe seus ovos preferencialmente em águas paradas depositadas em contêineres, comumente encontrados em áreas urbanas. (PINHEIRO, TADEI, 2002).

No continente americano na década de 1970 o mosquito *Aedes aegypti* foi erradicado na maior parte deste território, principalmente na região do território brasileiro, como mostra a figura 1

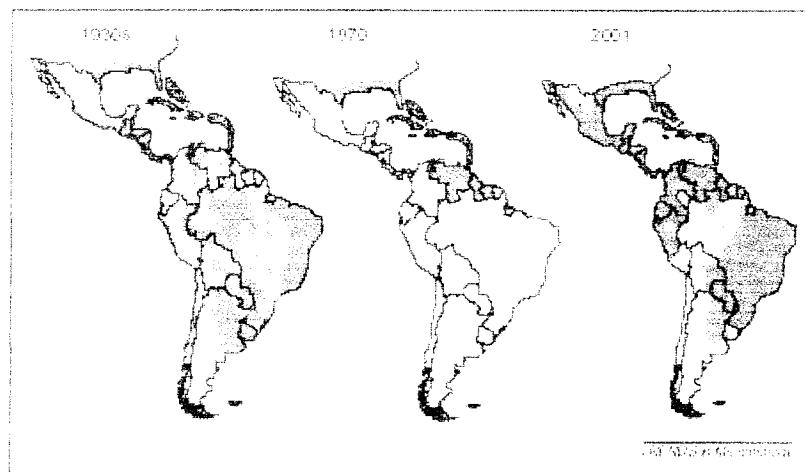


Figura 1. Distribuição do *Aedes aegypti* nas Américas nos anos de 1930, 1970 e 2001 (Gubler, 2002).

Os mosquitos são infectados pelo vírus após um repasto de sangue em pessoas com a doença em fase aguda. No lúmen do intestino médio, os vírus infectam as células epiteliais e, após um período de 8 a 12 dias, invadem outros tecidos do mosquito. Quando as glândulas salivares são atingidas, o mosquito torna-se um transmissor do vírus (GUBLER, 1998). No homem, após um período de incubação médio de 5 a 8 dias, ocorre uma viremia que persiste, em média, até o quinto dia da doença, em geral coincidindo com febre e caracterizando a doença aguda. O *Aedes aegypti* geralmente exibe um comportamento de alimentação ininterrupto, sendo que a maioria das fêmeas se alimenta de sangue múltiplas vezes entre as desovas. Esses fatores contribuem para a rápida transmissão do vírus e conseqüente natureza epidêmica da doença (BARATA et al., 2001).

O vírus pertence à Família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Apresenta envelope formado por uma bicamada lipídica contendo a glicoproteína E e proteína M. A partícula viral possui capsídeo icosaédrico, com diâmetro de 40 a 60 nm, formado por uma proteína C, sendo o ácido nucleico do tipo RNA de fita simples e polaridade positiva (ROMANOS, 2002).

São conhecidos 4 sorotipos do vírus da Dengue, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 e a distribuição geográfica desses sorotipos contribui para o desenvolvimento de hiperendemicidade (co-circulação de múltiplos sorotipos em uma determinada região) em áreas de clima tropical (GUBLER, 1998). Especificamente no Brasil, nos últimos anos têm sido identificados os sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 (PINHEIRO, TADEI, 2002), sendo que a introdução deste último sorotipo foi detectada no estado do Rio de Janeiro em 2001 (NOGUEIRA et al., 2001). A figura 2 mostra a circulação dos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 no Brasil nos anos de 2001 e 2002.

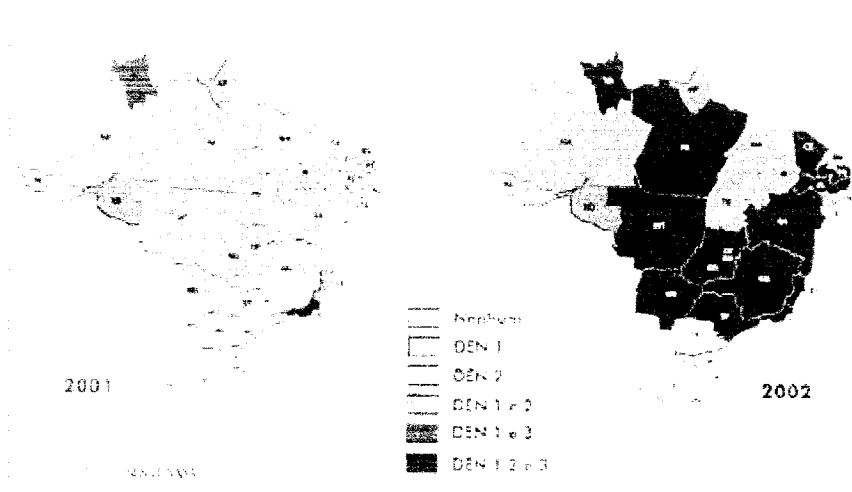


Figura 2: Sorotipo circulantes no Brasil, 2001 – 2002.

A infecção pelo vírus da dengue pode ser subclínica ou se caracterizar por sintomas clínicos que vão desde uma febre amena à manifestações clínicas severas. A dengue clássica se apresenta principalmente por um quadro febril, com erupção maculopapular, cefaléia, dor retro-ocular, mialgias, artralgias, náuseas e vômito. Já a febre hemorrágica por dengue (FHD) e a síndrome de choque por dengue (SCD) constituem as manifestações severas da infecção. (VAUGHN et al., 1997). A FHD caracteriza-se por: febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e insuficiência circulatória. O quadro de SCD se manifesta quando, depois de alguns dias de febre, o estado do paciente piora bruscamente, apresentando decréscimo da temperatura que poderá coincidir com sinais de insuficiência circulatória, pulsação rápida e débil, cianose peribucal, congestão e pele fria com manchas (RAMOS et al., 1993).

As manifestações severas da dengue podem estar relacionadas, entre outros fatores, à uma reação cruzada de anticorpos de um indivíduo que foi previamente infectado por um sorotipo diferente do que estiver causando a segunda infecção (ROCCO et al., 2001).

Tendo em vista a relevância clínica e epidemiológica da dengue, o monitoramento dos sorotipos circulantes foi reforçado após introdução neste país do sorotipo DEN-3 (NOGUEIRA et al., 2001), que possivelmente contribuiu para o aumento das manifestações clínicas severas - FHD e SCD (HALSTEAD, 1988; KLIKIS et al., 1988; KLIKIS et al., 1989; RICO-JESSE et al., 1997).

Portanto, um diagnóstico adequado é fundamental para a compreensão da epidemiologia da infecção e da doença (KAO et al., 2001), sendo, a técnica de isolamento viral em cultura de células, um método imprescindível tanto para o diagnóstico quanto para a pesquisa em dengue, pois evidencia-se a infecção da célula pelo vírus (YAMADA et al., 2002).

No ano de 2004, o CNPq - Saúde realizou uma chamada com o objetivo de financiar projetos de pesquisa em dengue e dentre os aprovados incluiu-se uma proposta da UFU, sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, intitulada: "Construção de uma biblioteca combinatorial de anticorpos (scFv) para seleção e caracterização de peptídeos sintéticos com potenciais diagnóstico e terapêutico contra o vírus da dengue". Para o desenvolvimento desse projeto foi necessário produzir antígenos virais para os quatro sorotipos do vírus da dengue.

Considerando que o referido projeto tem a colaboração do Laboratório de Virologia desta Universidade, foi proposto aqui a produção de antígenos para os sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 em cultura de células C6/36, provenientes de mosquito *Aedes*

albopictus, utilizando-se o método de imunofluorescência indireta (IFI) para a confirmação do isolamento dos 4 sorotipos.

2. Material e Métodos

2.1. Implantação e manutenção da linhagem de células C6/36

A implantação da linhagem contínua de células do mosquito *Aedes albopictus* - clone C6/36, no Laboratório de Virologia - UFU, utilizada para o isolamento dos vírus da Dengue, iniciou-se em de abril de 2004, a partir do gentil envio de duas garrafas "mães" pelo Setor de Arboviroses do Instituto Evandro Chagas – IEC, Belém-PA (Laboratório de referência para Dengue). As células foram imediatamente aliquotadas e estocadas em meio de congelamento, composto de 10% de DMSO (Dimetilsulfoxido) (Sigma Chemical Company - St. Louis, USA) e 90% de soro fetal bovino (SFB) (Cululab, Campinas-SP), em N₂ líquido.

Durante os meses de maio e junho de 2004, esta aluna realizou treinamento em manutenção de cultura de células da linhagem C6/36 e isolamento do vírus da Dengue, no Laboratório Central da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás (LACEM-GO), sob supervisão da responsável pelo setor, Msa. Valéria Cristina de Rezende Feres.

No Laboratório de Virologia UFU, iniciou-se a adaptação dessa linhagem de células, mediante descongelamento e subcultivo em garrafas de polipropileno (25 cm²) contendo 5 mL de meio de cultivo Leibovitz (L-15) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) completo (5% de SFB). As garrafas foram incubadas a 28°C em estufa bacteriológica, sendo observadas diariamente em microscópio invertido para verificação do crescimento celular e/ou possíveis contaminações.

A manutenção da linhagem celular (Fluxograma 2) foi realizada com o subcultivo ou repique, quando a monocamada celular se encontrava confluenta. Resumidamente, realizou-se a suspensão celular, batendo a garrafa com as mãos, para individualizar as células. Em seguida, 500 µL da suspensão celular foram distribuídos para cada garrafa de 25 cm² adicionando-se 4,5 mL de meio L-15 completo. As garrafas foram incubadas conforme descrito acima.

2.2. Estudo piloto para padronização da técnica da produção dos antígenos virais

Em outubro de 2004, com a finalidade de se padronizar a técnica de produção dos antígenos, inoculou-se em células C6-36, amostras dos vírus DEN-1, DEN-2 e DEN-3, gentilmente cedidas pelo LACEM-GO. Essas amostras foram provenientes de sangue total de pacientes, coletados na região de Goiânia e encaminhadas para o LACEM-GO, onde foram propagadas uma vez na linhagem de células C6-36 sendo o sorotipo viral confirmado pela reação de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando-se anticorpos monoclonais específicos contra cada sorotipo.

O inóculo das amostras foi realizado conforme previamente descrito por IGARASHI, 1978 e pelo protocolo fornecido pelo LACEM-GO, com algumas modificações. Resumidamente, o número de células foi contado e acertado para aproximadamente 5×10^5 células/mL, sendo as garrafas de 75 cm² preparadas com 1 mL de suspensão celular e 14 mL de meio L-15 completo e incubadas nas condições já referidas. Quando a monocamada celular encontrava-se semi-confluenta, um volume de 500 µL da amostra do vírus foi inoculado, sendo a garrafa incubada por 30 minutos a temperatura ambiente para a adsorção do vírus. Em seguida, foram acrescentados 14,5 mL de meio L-15 completo (2% de SFB). Uma garrafa para controle negativo, foi submetida as mesmas condições, apenas substituindo a amostra de vírus por meio de cultivo L-15 incompleto. A incubação foi realizada por sete dias ou até o aparecimento de efeito citopático (ECP). Uma observação diária foi realizada em microscópio invertido para verificar o aparecimento do efeito ou de possíveis contaminações.

Após o aparecimento do ECP, o sobrenadante celular foi coletado e centrifugado a 400g 10 min, 4°C. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer -70°C. O teste de imunofluorescência indireta foi realizado para a confirmação do crescimento viral.

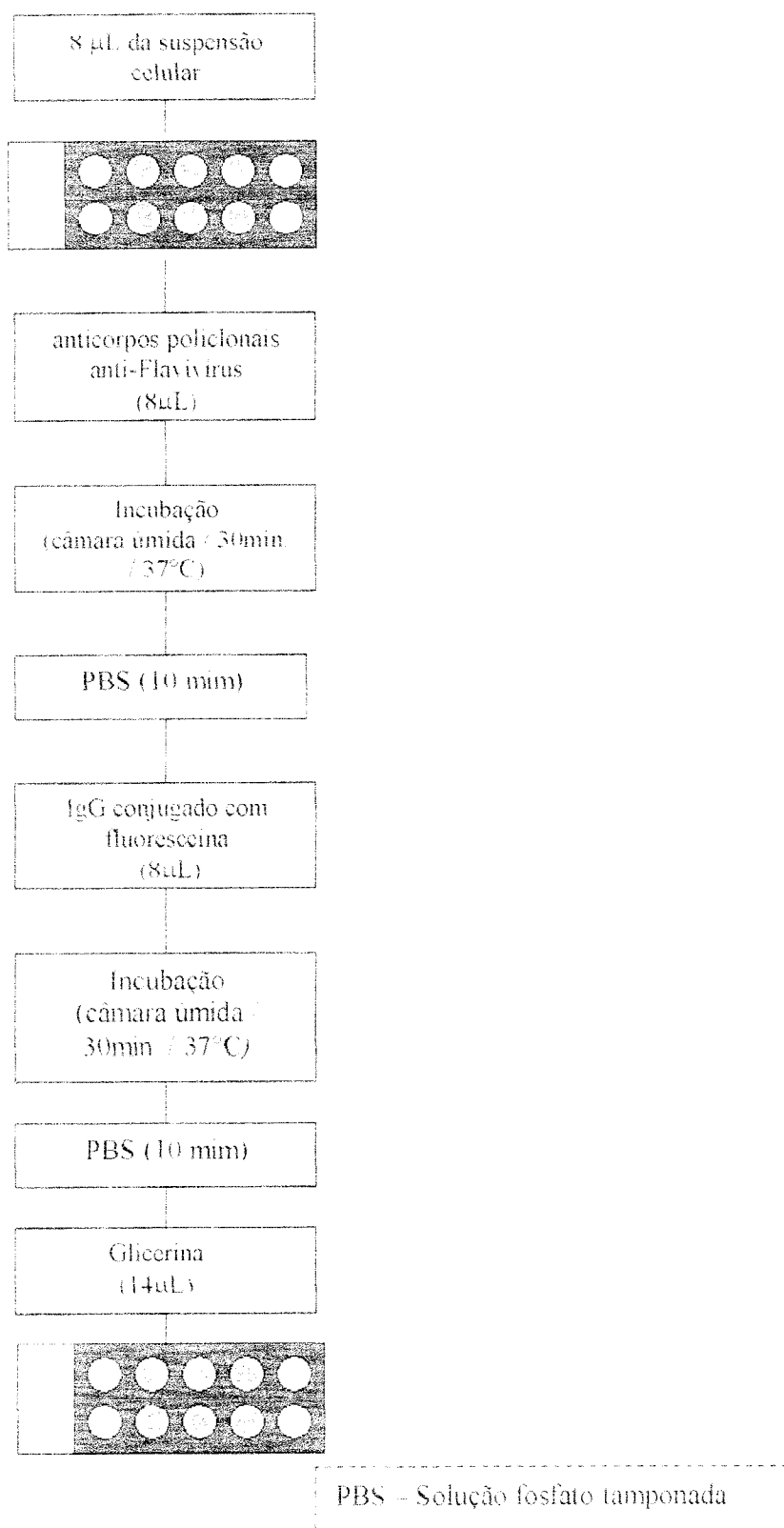
2.3 Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

As amostras provenientes do isolamento em cultura de células C6-36 foram centrifugadas (400g/10 min./4°C) e lavadas duas vezes em PBS (Phosphate-Buffered Saline) 0,01M (pH 7,2). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensão em aproximadamente 100µL de PBS, e 8µL desse sedimento foram transferidos para cada um dos orifícios de 4 lâminas recobertas por teflon, próprias para imunofluorescência. Essas foram secas dentro da capela de fluxo laminar e o sedimento foi fixado com acetona gelada por 10 minutos. Não sendo possível a execução imediata do teste, as lâminas foram armazenadas a -20°C até que a investigação fosse realizada.

A reação de IFI foi realizada conforme GÜBLER et al., 1984, utilizando-se reagentes gentilmente fornecidos pelo LACEM-GO. Deste modo, as lâminas foram tratadas com anticorpos policlonais anti-Flavivirus (soro hiperímune para o gênero Flavivirus, Instituto Evandro Chagas, Belem-PA). Em seguida, adicionou-se IgG de cabra anti-camudongo conjugado com fluoresceína (INC Biomedicals, Aurora, OH-USA) (Fluxograma 1).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de epi-fluorescência (Olympus BX50), sendo que o crescimento viral foi considerado positivo quando as células apresentavam fluorescência específica.

Fluxograma 1 - Reação de imunofluorescência indireta (IFI)



2.4. Produção dos antígenos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4

Amostras padrão liofilizadas dos sorotipos virais DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, foram gentilmente fornecidas pelo Setor de Arboviroses do Instituto Evandro Chagas – IEC, Belém-PA. As amostras foram recebidas em abril de 2004 e armazenadas em freezer -20°C

No período de novembro de 2004 a abril de 2005, amostras padrão dos sorotipos virais DEN-1, DEN-2 e DEN-3 (IEC) foram inoculadas em células C6-36, conforme protocolo cedido pelo LACEM-GO, com modificações baseadas no estudo piloto (anteriormente mencionado) realizado com amostras dos vírus DEN-1, DEN-2 e DEN-3.

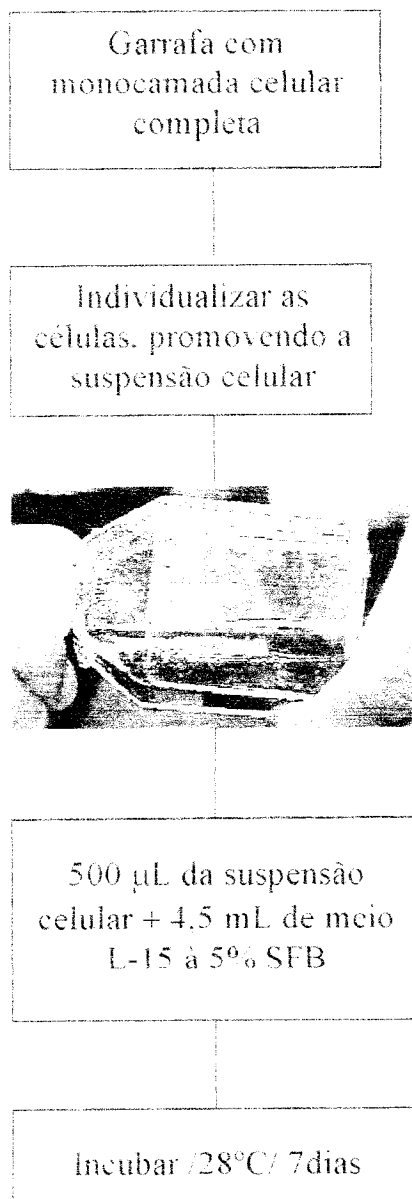
Resumidamente, garrafas de 25 cm² foram preparadas com 500 µL da suspensão celular e 4,5 mL de meio L-15 completo (proporção 1:10) e incubadas à 28°C em estufa bacteriológica (Fluxograma 2). Para o inóculo de cada sorotipo foram utilizadas três garrafas com monocamada celular semi-confluentes.

A amostra padrão liofilizada foi diluída em 1,5 mL de água bidestilada e autoclavada, sendo inoculados 500 µL desta diluição em cada garrafa. Estas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, para a adsorção do vírus e logo após, foram acrescentados 4,5 mL de meio L-15 completo (2% de SFB). Uma garrafa de controle negativo foi preparada para cada garrafa inoculada, sendo estas submetidas às mesmas condições dos inóculos, apenas substituindo a amostra do vírus por 500 µL de água bidestilada e autoclavada. A incubação foi realizada por sete dias ou até o aparecimento do efeito citopático (ECP). Uma observação diária foi realizada em microscópio invertido para verificação do aparecimento do efeito ou de possíveis contaminações.

Após o aparecimento do ECP, o sobrenadante celular foi coletado e centrifugado (400g/10 min, 4°C). Todo este procedimento foi realizado em banho de gelo (Fluxograma 2). Uma alíquota foi utilizada para o subcultivo com o objetivo de produzir maior volume de antígeno viral, sendo utilizado o mesmo protocolo do inóculo. As amostras foram alíquotadas em tubos de criopreservação e armazenadas em freezer -70°C.

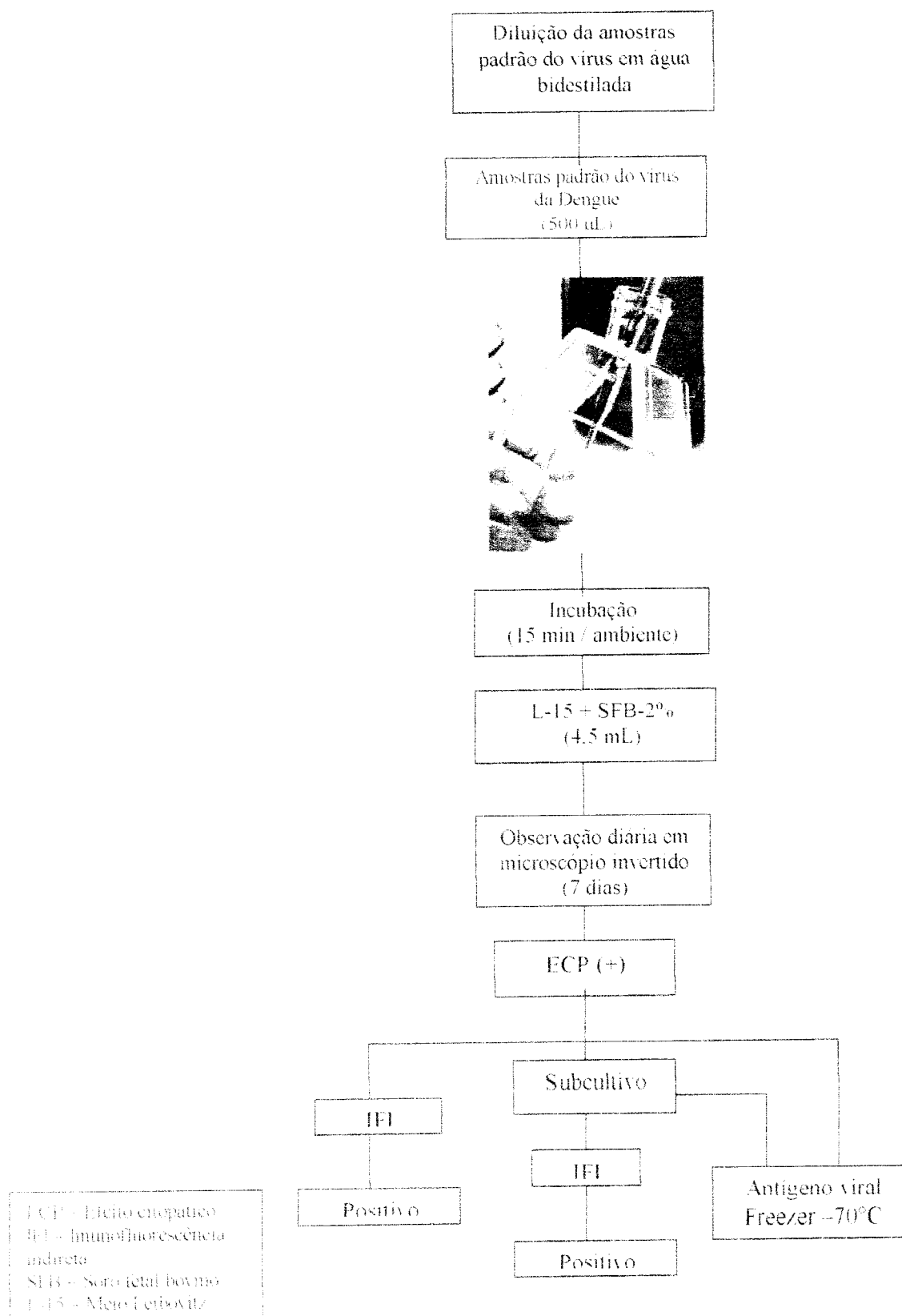
O teste de imunofluorescência indireta foi realizado para a confirmação do crescimento viral, conforme anteriormente mencionado.

Fluxograma 2 - Manutenção da linhagem de células C6 36



SFB – Soro fetal bovino
L-15 – Meio Leibovitz

Fluxograma 3 – Produção dos antígenos virais da Dengue em cultura de células



3. Resultados e discussão

A implantação da linhagem contínua de células do mosquito *Aedes albopictus* - clone C6-36, utilizado para o isolamento dos vírus da Dengue, foi realizada com êxito, apesar de algumas dificuldades encontradas. No princípio a cultura celular C6/36 foi diversas vezes contaminadas por bactérias Gram positivas - acredita-se que a água destilada, utilizada na preparação dos reagentes poderia estar contaminada. Esse problema foi resolvido após a bi-destilação e autoclavação da água a ser utilizada.

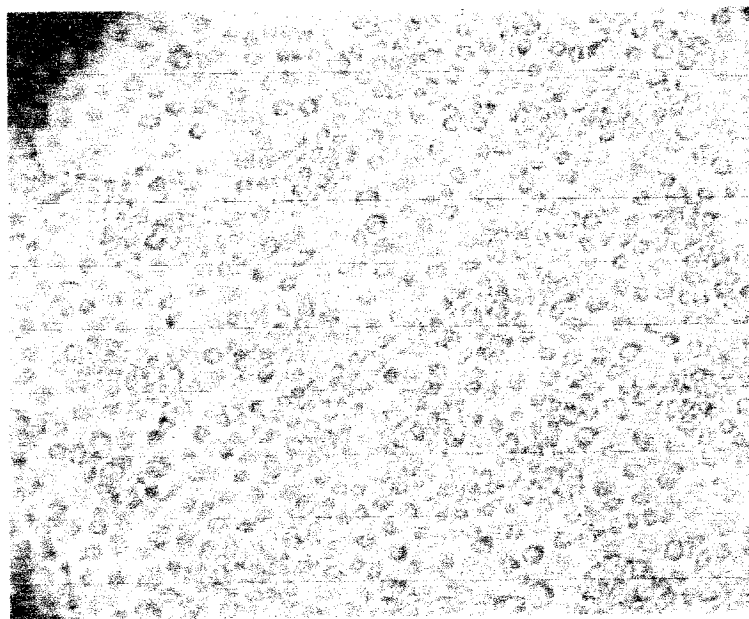
No estudo piloto, os vírus DEN-1 e DEN-3 provenientes de isolados de sangue total de pacientes com Dengue foram crescidos em células C6/36. As garrafas inoculadas com o sorotipo DEN-2 apresentaram contaminação, apesar de os controles dessas garrafas não o terem sido. Assim hipotetiza-se que a amostra do vírus DEN-2 poderia estar contaminada.

Com base no estudo piloto, foi possível realizar algumas modificações no protocolo para a produção dos antígenos, por exemplo: a linhagem de células não se adaptou as garrafas de tamanho 75 cm³. Também, havia um risco maior de ocorrer contaminações nessas garrafas, então optou-se por utilizar garrafas de 25 cm³.

A produção dos antígenos da Dengue foi iniciada pela inoculação da amostra padrão do sorotipo DEN-1. No segundo dia após o inóculo, observou-se grande quantidade de células no sobrenadante, enquanto que o efeito citopático (ECP) do tipo sincício foi observado no terceiro dia após o inóculo (Figura 2). Não se sabe se a agressão que as células sofreram no momento do inóculo e ou uma possível maior quantidade de vírus inoculado podem ter contribuído para o aparecimento das células em suspensão, já que as garrafas controle não apresentaram células em suspensão. Após a visualização do ECP o sobrenadante celular foi imediatamente coletado e o subcultivo realizado. No subcultivo o ECP foi observado no quarto dia após o inóculo.



(A) Celulas C6/36 infectadas pelo virus Dengue tipo 1



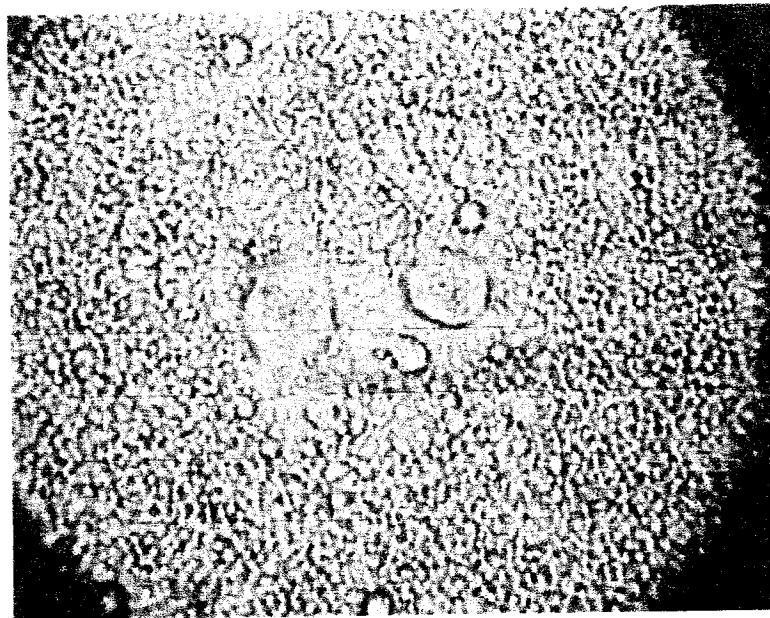
(B) Controle negativo para Dengue-1.

Figura 2. (A) Efeito citopatico do sorotipo Dengue 1. (B) Controle negativo para Dengue-1.

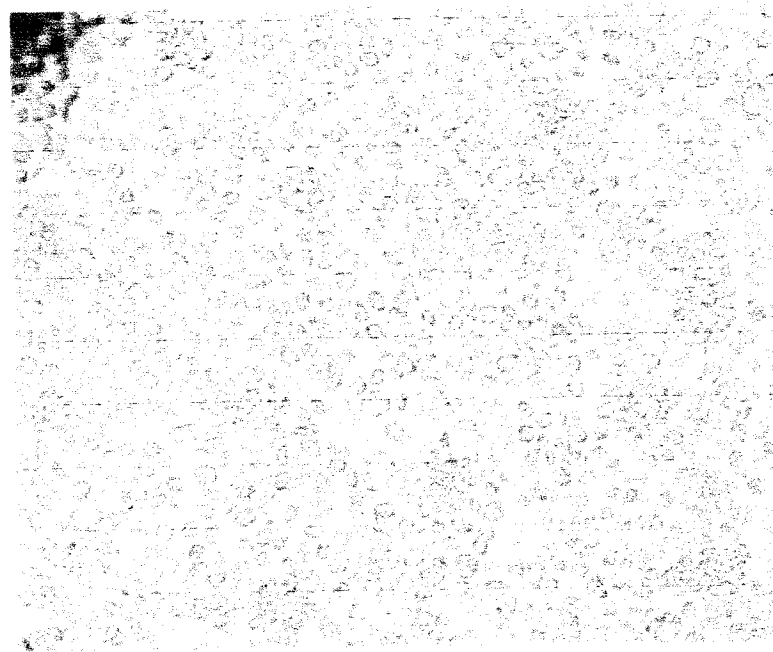
A produção dos antígenos virais DEN-2, DEN-3 e DEN-4 transcorreu de maneira semelhante à do antígeno viral DEN-1. Entretanto, conforme observado na tabela 1, o sorotipo DEN-2 apresentou ECP no quarto dia após o inóculo da amostra padrão (Figura 3) enquanto que no subcultivo foi observado no terceiro dia.

Tabela 1: Número de dias necessários para a observação do ECP após o inóculo das amostras dos sorotipos DEN-1 a 4 em células C6/36.

Sorotipo Viral	Nº de dias para a visualização do ECP após o inóculo	Nº de dias do ECP após o subcultivo
DEN-1	3	4
DEN-2	4	3
DEN-3	3	3
DEN-4	3	3



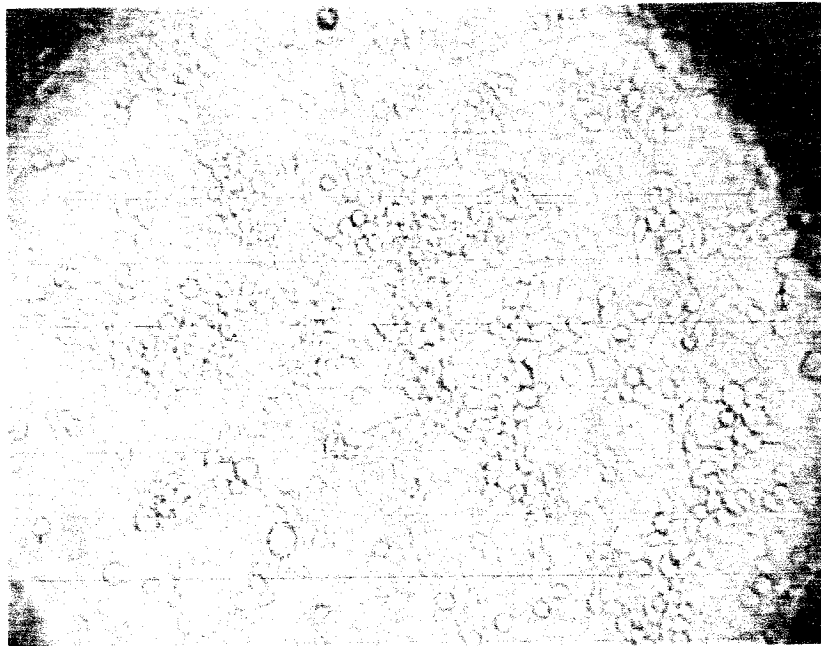
(A) Células C6/36 infectadas pelo vírus Dengue tipo 2



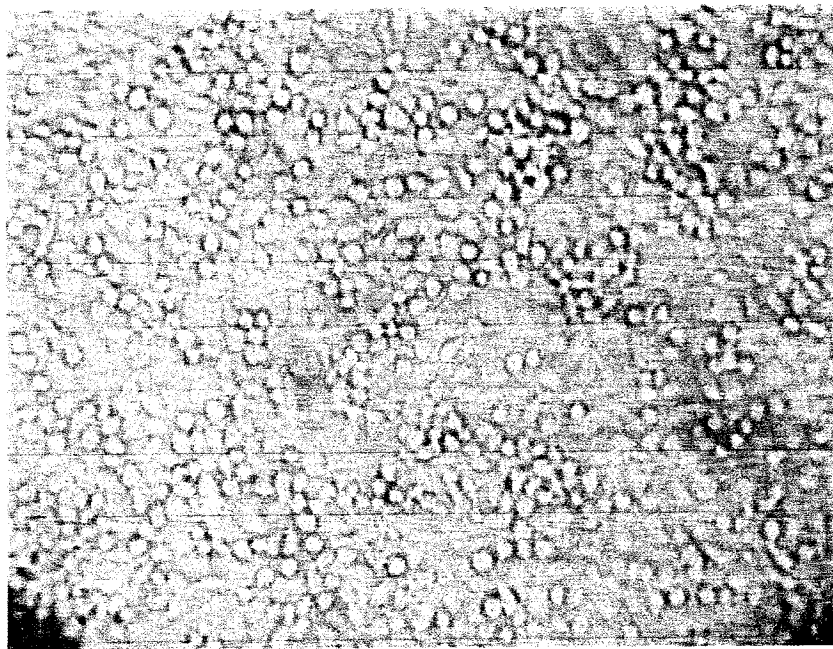
(B) Controle negativo para Dengue-2

Figura 3 - (A) Efeito citopático do sorotipo Dengue 2. (B) Controle negativo para Dengue 2

O ECP causado pelo sorotipo viral DEN-3 foi observado no quarto dia após o inoculo (Figura 4) e no terceiro dia após o subcultivo



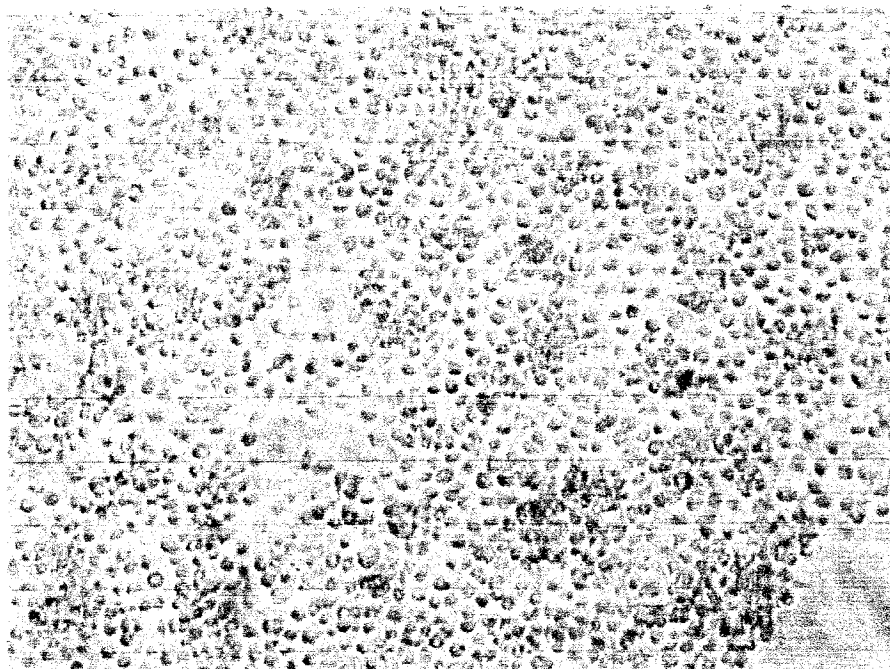
(A) Células C6/36 infectadas pelo vírus Dengue tipo 3



(B) Controle negativo de Dengue-3

Figura 4. (A) Efeito citopático do sorotipo Dengue 3. (B) Controle negativo para Dengue-3.

Para o sorotipo DEN-4 o FCP foi visualizado no terceiro dia após o inóculo da amostra padrão quanto para o subcultivo (Figura 5)



(A) Células C6/36 infectadas pelo vírus Dengue tipo 4



(B) Controle negativo para Dengue-4

Figura 5. (A) Efeito citopático do sorotipo Dengue 4. (B) Controle negativo para Dengue-4.

A confirmação do "crescimento viral" dos sorotipos Dengue 1-4 foi realizado pela reação de imunofluorescência indireta conforme observado nas figuras 6, 7, 8 e 9. A figura 10 mostra o controle negativo da reação



Figura 6: Reação de IFI para DEN-1



Figura 7: Reação de IFI para DEN-2

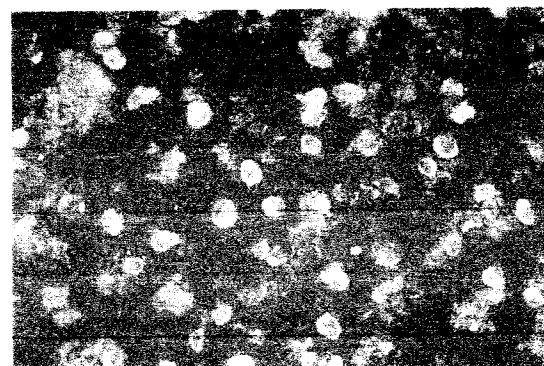


Figura 8: Reação de IFI para DEN-3

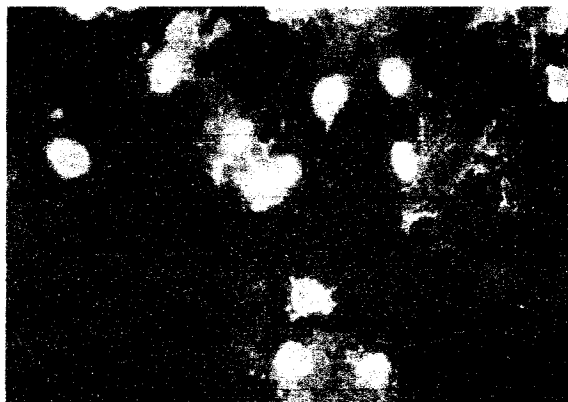


Figura 9. Reação de IFI para DEN-4

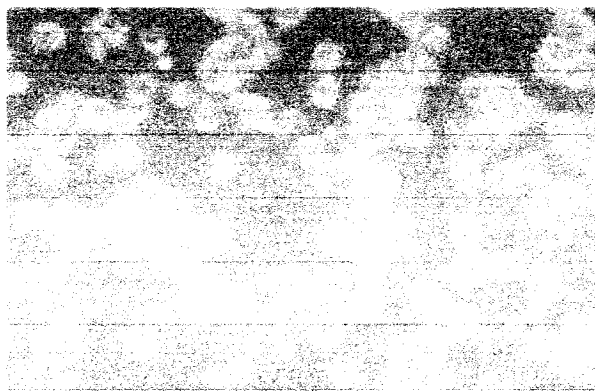


Figura 10: Controle Negativo da IFI para Dengue

4. Considerações finais

- A produção de antígenos virais para os sorotipos virais da Dengue é importante para o desenvolvimento de futuras pesquisas.
- Este estudo reafirmou que, apesar de requerer habilidades técnicas, a cultura de células é um método padrão para a pesquisa em virologia.
- A titulação dos antígenos virais é imprescindível para que se possa determinar o número de partículas virais viáveis por mL do antígeno.

5. Referencias Bibliográficas

BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; NETO, F. C.; GLASSER, C. M.; BARATA, J. M. S.; NATA, D. População de *Aedes aegypti* (L) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.35, n.3, 2001.

Igarashi A 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40, 531-544.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165.

GUBLER, D. J. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. **Bulletin of PAHO**, v.23, n.4, p. 397 – 404, 1989.

GUBLER, D. J. The global pandemic of dengue dengue hemorrhagic fever, current status and prospects for the future. **Annals Academy of Medicine of Singapore**, v 27, n 2, p 227-34, 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Microbiology**, v 10, n 2, p 100-103, 2002.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v.239, p 476-81, 1988.

KAO, C. L.; WU, M. C.; CHIU, Y.H.; LIN, J.L.; WU, Y.C.; YUEH, Y. Y.; CHEN, L. K.; SHAO, M. F.; KING, C. C. Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for

- rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.10, p.3672-7, 2001.
- KLIKS, S. C., NIMMANITYA, S., NISALAK, A., BURKE, D. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.38, n.2, p.411-9, 1988.
- KLIKS, S. C., NISALAK, A., BRANDT, W. E., WAHL, L., BURKE, D. S. Antibody - dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.40, n.4, p.444-51, 1989.
- Ministério da Saúde (MS) Fundação Nacional de Saúde (FNS) Centro Nacional de Epidemiologia (CNE). **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**, 4ª ed., cap. 5.4. Coordenação de Comunicação, Educação e Documentação – COMED/ASPLAN/FNS, Brasília - DF, 1998.
- NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., FILIPPIS, A. M. B., PEREIRA, M. A. S., SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.7, p.925-6, 2001.
- PINHEIRO VC, TADEI WP. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista Instituto Medico Tropical São Paulo**, São Paulo, v.44, n.5, p.245-50, 2002.
- RAMOS, C.; GARCIA, H.; VILLASECA, J. M. Fiebre Hemorrágica y Síndrome de Chouque por Dengue. **Salud Pública de México**, v.35, n.1, 1993.
- RICO-HESSE, R., HARRISON, L. M., SALAS, R. A., TOVAR, D., NISALAK, A., RAMOS, C., BOSHELL, J., MESA, M. T. R. DE, NOGUEIRA, R. M. R., ROSA, A. T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increase pathogenicity in the Americas. **Virology**, New York, v.230, p.244-51, 1997.

ROCCO, I. M., KAVAKAMA, B. B., SANTOS, C. L. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista Instituto Medico Tropical São Paulo**, São Paulo, v.43, n.1, p.55-7, 2001.

ROMANOS, M. T. V. Febre Amarela e Dengue. In: SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V., WIGG, M. D. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.177-181.
SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EUA, 2001.

VALLE, R. D. J., ANGEL, R. M. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v.24, n.3, p.203-9, 2002.

VAUGHN, D. W., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A., NISALAK, A. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **The Journal of Infectious Diseases**, v.176, p.322-30, 1997.

YAMADA, K., TAKASAKI, T., NAWA, M., KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v.24, n.3, p.203-9, 2002.