

***Universidade Federal de Uberlândia
Curso de Ciências Biológicas***

***Determinação de Frações Protéicas dos
Sorotipos DEN-1 e DEN-2 do Vírus da
Dengue pelo teste "Western-Blotting"***

Juliano Sousa Mendes

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

**Uberlândia - MG
Dezembro - 2000**

***Universidade Federal de Uberlândia
Curso de Ciências Biológicas***

***Determinação de Frações Protéicas dos
Sorotipos DEN-1 e DEN-2 do Vírus da
Dengue pelo teste "Western-Blotting"***

Juliano Sousa Mendes

Monografia aprovada pela banca examinadora em ___/___/___ Nota: _____ Ptos.

Prof. Dr. José Roberto Mineo

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

Prof^a. Dr^a. Janethe Deolina Oliveira Pena

Uberlândia - MG
Dezembro - 2000

Agradecimentos

Agradeço a todos do Laboratório de Imunologia da UFU, Adriana, Deise, Patrícia, Hélio Júnior e Paulo Júnior, Ronaldo, Mônica, Giuliano e Marjorie, Danielle, Tiago e Fernanda, Gabriela, Max.

Em especial à atenção recebida por Maria Aparecida Souza. Pela paciência e exemplo de profissionalismo.

E à Beth, pelo início de tudo e pela ajuda com os ELISA's.

Agradeço a todos os professores da disciplina de Imunologia, Ernesto, Rodolfo, Jair Jr., Janethe.

E em especial ao Prof. José Roberto Mineo e à Profª Divina Queiroz pela orientação e exemplos como pesquisadores.

Agradeço a toda 4ª Turma de Ciências Biológicas, Gêmeas, Ronan, Christian, Guilherme, Fandi, Paulo Estefano, Hipólito, Viviane, Rodrigo Feltran, M. Tereza, Cláudia Moreno e Cláudia Costa, Eduardo, Graziela, Jaqueline, Cadu, Léo Brasil, John, Helisângela, Cristina Madeira, Ana Cristina e Patrícia Maria.

E a todos alunos das turmas vizinhas que convivi durante todo esse tempo. Que são muuuuitos...

Agradeço e ofereço

Agradeço a meus pais Luis e Heloisa, pelo apoio e pela
sempre confiança que tiveram em mim.

A minha amiga, namorada, companheira, sempre comigo,
Cláudia. :')

A meus dois irmãos André e Neto.

E a todos meus amigos e familiares.

Agradeço a DEUS.

R e s u m o

Com o objetivo de estudar o comportamento dos testes sorológicos para Dengue foram investigados 40 amostras de soros humanos divididos em quatro grupos de acordo com o as seguintes características: Grupo 1, amostras não reativas para os sorotipos DEN-1 e DEN-2; Grupo 2, amostras reativas para ambos sorotipos; Grupo3, amostras fortemente reativas para DEN-1 e não reativas para DEN-2; e, Grupo 4, não reativas para DEN-1 e reativas para DEN-2. Foram estudados os testes Mac-ELISA, que detecta anticorpos da classe IgM monoespecíficos para DEN-1 e DEN-2, e o Teste Dengue-Duo PanBio que detecta anticorpos da classes IgG e IgM para ambos sorotipos. Em adição avaliou-se o comportamento eletroforético do “*immunoblotting*” procurando evidenciar marcadores sorológicos em cada um dos grupos avaliados. Na comparação dos testes MacELISA e PanBio, em relação ao anticorpo IgM, observou-se que todos sorotipos DEN-1 dos quatro grupos não demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$). No entanto, quando comparada a detecção de IgM do sorotipo DEN-2 encontrou-se diferenças estatísticas significativas nos grupos 2, 3 e 4 ($p<0,05$). No grupo 1 não houve diferenças estatísticas significativas. A análise do perfil eletroforético mostrou perfis característicos somente para o grupos 2. Onde foi encontrado os seguintes resultados: Grupo 2, sorotipo DEN-1, anticorpo IgG: 6 frações antigênicas encontradas; Grupo 2, sorotipo DEN-1, anticorpo IgM: 9 frações antigênicas encontradas; Grupo 2, sorotipo DEN-2, anticorpo IgG: 23 frações antigênicas encontradas; e, Grupo 2, sorotipo DEN-2, anticorpo IgM: 20 frações antigênicas encontradas.

Sumário

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico - Surgimento da Dengue como um problema de saúde pública mundial	1
1.2 A Dengue no Brasil	3
1.3 A Dengue em Minas Gerais	7
1.4 A Dengue em Uberlândia	8
1.5 Etiologia e etiopatogenia	10
1.6 Fatores imunológicos	12
1.7 Proteínas Estruturais do Vírus da Dengue	13
1.8 Diagnóstico Laboratorial	14
2- OBJETIVOS	18
3- MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Obtenção das amostras de soro	19
3.2 Obtenção dos antígenos DEN-1 e DEN-2	19
3.3 Mac-ELISA	19
3.4 Grupos de soros	20
3.5 PanBio	21
3.6 Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-Page)	22
3.7 <i>Western-Blotting</i>	24
3.8 Análise Estatística dos dados	25
4- RESULTADOS	27
4.1 Mac-ELISA	27
4.2 PanBio	36
4.3 Análise Estatística.....	44
4.4 <i>Western-Blotting</i>	61
5- DISCUSSÕES	64
6- CONCLUSÕES	67
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8- ANEXOS	74

1-INTRODUÇÃO

1.1. Histórico - Surgimento da Dengue como um problema de saúde pública mundial

As primeiras descrições de Dengue, compreendida como síndrome febril, de início súbito, acompanhada de mialgia generalizada, artralgia, cefaléia, dor retro-orbital e hiperemia conjuntival com a presença eventual de exantema, acometendo extensas parcelas da população de determinada região, remontam ao ano de 1779, tendo sido observado em lugares tão distantes entre si como a Ilha de Jakarta, na Ásia, e as cidades do Cairo e Alexandria, no Egito (SIIER et al, 1926).

Em 1906, Bancroft demonstrou ser o *Aedes aegypti*, o principal vetor dessa arbovirose (de “arthropod-borne”, isto é, vírus transmitido por artrópode), quando observou os hábitos diurnos da espécie transmissora, pela infecção de voluntários.

O primeiro isolamento do vírus Dengue foi feito por Albert Sabin (SABIN, 1952) ao final da Segunda Guerra Mundial, tendo identificado então dois sorotipos, posteriormente conhecidos como vírus Dengue tipo 1 e 2 (DEN-1 e DEN-2). Demonstrou ainda, que após um período de imunidade cruzada, em média de 2 meses, era possível provocar quadro clínico semelhante em seres

humanos submetidos, em seqüência, às picadas de mosquitos infectados por DEN-1 e DEN-2.

A importância atual do Dengue deve-se a um novo padrão da doença que apareceu no Sudeste asiático, na década de 1950, em surtos nas Filipinas e Tailândia, que se caracteriza pela presença de hemorragias, trombocitopenia, choque por saída de plasma do espaço intravascular e a não rara evolução para o óbito e que foi denominada Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome de Choque do Dengue (FHD/SCD). Foram isolados por Hammon (HAMMON, 1960), nesse período, em pacientes com esta nova síndrome, os vírus Dengue tipo 3 e 4 (DEN-3 e DEN-4), além dos sorotipos anteriormente identificados por Sabin.

Posteriormente, na década de 1980, no continente americano, com a introdução de DEN-2 em Cuba, que já havia referido casos em 1977 por DEN-1, ocorreu a epidemia de 1981, foram notificados 344.203 casos com 116.143 internações, ou seja, 10% da população do país, tendo havido 158 óbitos, 101 dos quais em crianças menores de 14 anos.

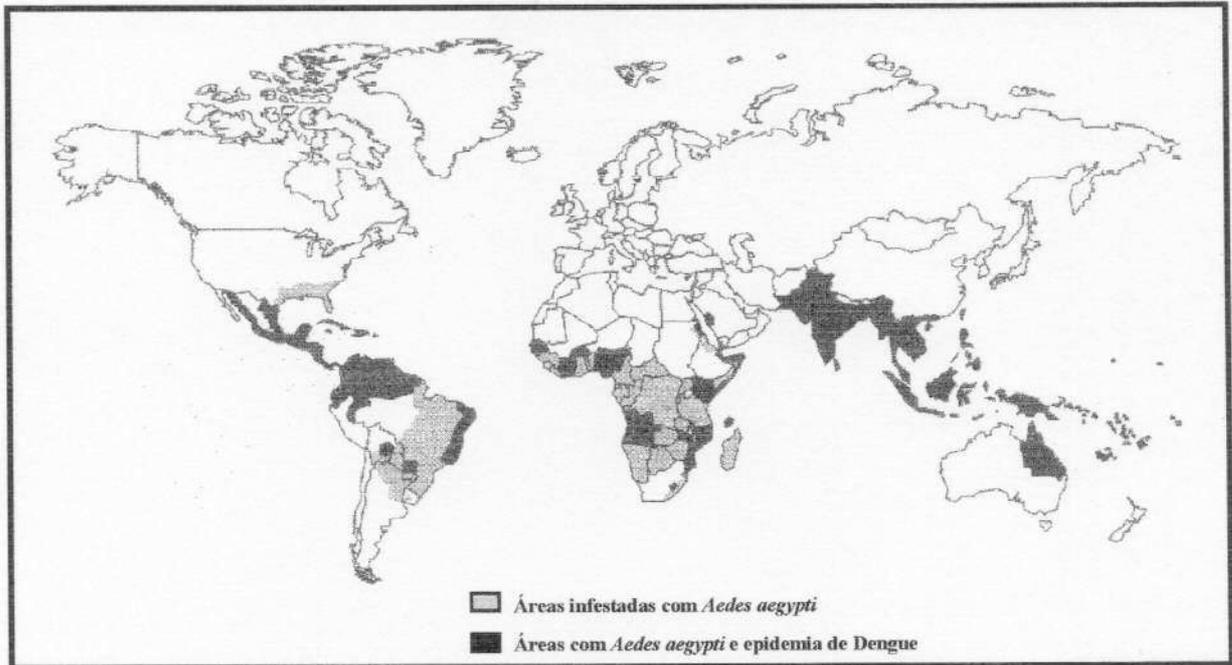


Figura 1. Mapa de distribuição mundial da Dengue e do *Aedes aegypti* em 1998. (GUBLER, 1998)

1.2. A Dengue no Brasil

A história recente do Dengue no Brasil se iniciou após se verificar, no final da década de 1960, devido ao declínio dos programas de erradicação do *Aedes aegypti*. Detectou-se o mosquito inicialmente em Belém, PA em 1967 e em São Luiz, MA em 1969, focos erradicados somente em 1973. Posteriormente, houve a reinfestação das cidades de Salvador, BA em 1976 e Rio de Janeiro, RJ em 1977, difundindo-se para outros Estados do Brasil, a partir de então. Em 1986, foi detectado *Aedes albopictus* no Estado do Rio de Janeiro, durante uma epidemia de Dengue, e posteriormente em outros quatro Estados.

O primeiro surto de Dengue em que houve isolamento do vírus, DEN-1 e DEN-4, aconteceu em fins de 1981, em Boa Vista, RR. O que chamou a atenção, por ter ocorrido em área enzoótica de Febre Amarela.

No período de 1986/87, extensas epidemias pelo sorotipo 1 ocorreram nas regiões Sudeste e Nordeste, nos Estados do Rio de Janeiro, Alagoas e Ceará. Nesse período também foram notificados casos nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e São Paulo.

Cerca de três anos depois em 1990 e 1991, foram referidos surtos pelo sorotipo 1 na cidade de Ribeirão Preto, SP; no Estado de Mato Grosso e na região do Triângulo Mineiro, referem surtos pelo sorotipo 1. No mesmo período houve relato de uma epidemia de Dengue no Ceará

Em abril de 1990 o vírus DEN-2 foi isolado na cidade de Niterói, RJ, concomitantemente ao sorotipo 1, detectado na epidemia ocorrida nos meses de maio/90 a abril/91, na região do Grande Rio, Niterói e cidades vizinhas. Em junho/90 foi isolado o sorotipo 2 de um caso fatal de Febre Hemorrágica do Dengue. Nesse período foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde 1.316 casos de Febre Hemorrágica do Dengue, mas, de apenas 150 pôde-se obter dados clínico-laboratoriais que preenchiam os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), de definição de caso de FHD/SCD. Relatou-se 39 óbitos, com a confirmação do diagnóstico para 11, dos quais 8 por necrópsia, 2 por sorologia e um por isolamento de DEN-2.

Em 1991 na cidade de Araguaína, Estado de Tocantins, área enzoótica de Febre Amarela, ocorreu um surto, no qual foram obtidas amostras positivas de vírus DEN-2.

No Estado de Alagoas foi referido o isolamento do vírus DEN-2, em julho/91, porém, sua circulação foi restrita, devido aos baixos índices de infestação pelo *Aedes aegypti*. Em 1994 este sorotipo foi novamente isolado durante um surto em Maceió, que se estendeu para outros municípios do Estado. Não houve relato de casos graves, isto é, FHD/SCD, apesar da grande extensão da epidemia.

No Estado do Ceará foi observado a partir de março de 1994, um surto de doença febril exantemática, que se pensou, inicialmente, tratar-se de Rubéola, porém, os soros testados foram negativos para esta virose. No final de maio, o Departamento de Virologia-IOC, da Fundação Oswaldo Cruz-RJ, isolou o vírus DEN-2, em quatro amostras enviadas. Nesse período, começaram a ser notificados à Secretaria de Saúde, casos mais graves, com relato de óbitos, sendo um desses, decorrentes de infecção primária pelo vírus DEN-1, isolado no Instituto Evandro Chagas, da Fundação Nacional de Saúde, Belém-PA. Até dezembro de 1994, 25 casos confirmados de FHD/SCD, com 12 óbitos foram notificados.

Até março de 1995, foi evidenciada a transmissão de vírus Dengue em 16 Estados: Pará, Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Foi reconhecida, também, a presença do *Aedes aegypti* na quase totalidade dos Estados da Federação, à exceção do Acre, Amapá e Amazonas, o que foi atribuído às dificuldades da vigilância entomológica nestas regiões.

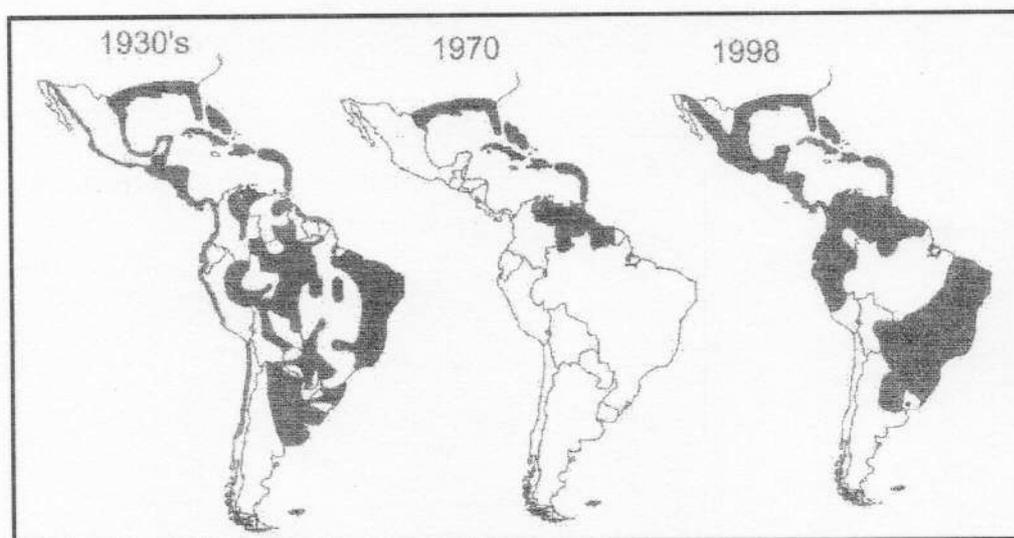


Figura 2. Distribuição de *Aedes aegypti* na décadas de 30, 70 e em 1998. (GUBLER, 1998)

1.3. A Dengue em Minas Gerais

A primeira notificação de Dengue no Estado de Minas Gerais ocorreu em 1987 no município de Pirapetinga, situado na Zona da Mata, limítrofe ao Estado do Rio de Janeiro, com 527 casos notificados. A ocorrência de casos em alguns municípios vizinhos, nesta ocasião, não foi devidamente esclarecida. A partir desse ano até 1990, não se registrou transmissão autóctone da enfermidade no Estado.

Em 1991, foram relatadas epidemias na região do Triângulo Mineiro, com 286 casos notificados, envolvendo os municípios de Fronteira, Frutal, Nova Ponte e Prata. Posteriormente, em 1993, houve nova incursão do vírus Dengue nesta região, acometendo municípios, como Uberlândia, Ituiutaba, Araguari, Santa Vitória e Monte Alegre de Minas, com 3.728, 104, 79, 53, 41 casos notificados, respectivamente. Nesta região, registrou-se os maiores índices de infestação predial e a maior dispersão do *Aedes aegypti* no Estado.

Considerando as dificuldades enfrentadas pela vigilância epidemiológica do Dengue no Estado de Minas Gerais, acreditou-se que em alguns outros municípios, com infestação significativa por *Aedes aegypti*, tenha havido circulação do vírus Dengue, sem a devida notificação, investigação e posterior confirmação de casos autóctones.

1.4. A Dengue em Uberlândia

Uberlândia esta atualmente atravessando um processo epidêmico. E as autoridades vêm se preparando com campanhas educativas junto aos veículos de comunicação e escolas.

Constantemente o método de combate ao inseto vetor com aspersão de inseticida - popularmente conhecido como 'fumacê' - tem sido aplicado nos diferentes bairros de Uberlândia em combate ao *Aedes aegypti*. Como parte deste programa, funcionários visitam os lares à procura de focos que possibilitem a proliferação do mosquito vetor.

A seguinte tabela mostra o número de casos notificados nos bairros de Uberlândia de janeiro a outubro de 2000.

Bairro	Distrito Sanitário	Nº de casos
Aclimação	Leste	9
Altamira	Sul	1
Alvorada	Leste	1
Aparecida	Centro	6
Aurora	Sul	4
Bom Jesus	Centro	4
Brasil	Centro	12
Canaã	Oeste	13
Cazeca	Leste	2
Centro	Centro	13
Chácaras Tubalina	Oeste	2
Cid. Jardim	Oeste	4
Copacabana	Sul	5
Custódio Pereira	Leste	13
Daniel Fonseca	Oeste	10
Dom Almir	Leste	13
Dona Zulmira	Oeste	27

Continua...

Bairro	Distrito Sanitário	Nº de casos
Gal. Ozório	Sul	2
Gramado	Norte	2
Granada	Sul	5
Guarani	Oeste	6
Ipanema	Leste	8
Jaraguá	Oeste	13
Jd. Califórnia	Leste	4
Jd. Finotti	Leste	2
Jd. Ozanam	Sul	1
Jd. Brasília	Norte	4
Jd. das Palmeiras	Oeste	10
Jd. Holanda	Oeste	3
Jd. Patrícia	Oeste	12
Lagoinha	Sul	2
Laranjeiras	Sul	3
Leão 13	Sul	1
Liberdade	Norte	1
Luizote de Freitas	Oeste	122
Mansour	Oeste	22
Maravilha	Norte	3
Marta Helena	Norte	2
Martins	Centro	25
Morada Nova	Oeste	2
Morumbi	Leste	16
N. S. das Graças	Norte	2
Oliveira	Norte	1
Pacaembú	Norte	3
Paineiras	Sul	2
Pampulha	Sul	2
Planalto	Oeste	19
Pres. Roosevelt	Norte	12
Quintas do Bosque	Leste	2
Santa Maria	Leste	2
Santa Mônica	Leste	44
Santo Inácio	Oeste	7
São Gabriel	Sul	2
São Jorge	Sul	7
São José	Norte	1
São Lucas	Oeste	2
Saraiva	Sul	11
Segismundo Pereira	Sul	4
Seringueiras	Sul	6
Sta Luzia	Sul	3
Taiaman	Oeste	6
Talismã	Oeste	1
Tancredo Neves	Oeste	1
Thomaz Resende	Centro	2
Tibery	Leste	37
Tocantins	Oeste	13
Tubalina	Oeste	10
Umuarama	Norte	7
Vigilato Pereira	Sul	3

FONTE: Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância Epidemiológica, Uberlândia, MG

1.5 Etiologia e etiopatogenia

Os vírus Dengue pertencem ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, cujo protótipo é o vírus da Febre Amarela. Têm como local preferencial para replicação no ser humano, as células do sistema fagocítico-mononuclear. A Febre do Dengue, assim como a Febre Hemorrágica do Dengue, pode ser causadas por quaisquer dos quatro sorotipos já mencionados.

São transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o único vetor responsável pelas epidemias de Dengue descritas no País até a presente data. Porém, o *Aedes albopictus* tem sido descrito como agente transmissor da doença em epidemias no Japão e na China, O homem, após um período de incubação de 3-15 dias (usualmente de 5 a 8 dias), apresenta viremia que persiste, em média, até o quinto dia da doença, em geral coincidindo com a febre, durante a qual pode infectar mosquitos das referidas espécies.

As razões do aparecimento do Dengue Hemorrágico no Sudeste asiático, têm sido objeto de estudos com conclusões muitas vezes divergentes. O grupo liderado por Halstead (1970) sugeriu, que a existência prévia de anticorpos heterólogos, facilitariam a infecção de macrófagos por ocasião de uma segunda infecção, por outro sorotipo, resultando em maior replicação viral, ativação do complemento, consumo dos fatores da coagulação e liberação de citocinas responsáveis pelo aumento da permeabilidade capilar. De acordo com os autores

a presença de Dengue Hemorrágico em menores de 1 ano de idade por ocasião de sua primeira infecção, pois os anticorpos maternos ainda circulantes teriam papel semelhante aos obtidos por uma infecção natural.

Já ROSEN (1977) considerou que a ampla circulação de cepas mais virulentas, resultante do crescimento urbano desordenado e de maiores facilidades de transporte, teria papel predominante. Essas abordagens mostraram-se insuficientes isoladamente. E KOURI (1977) propôs um modelo multicausal, (Figura 3). O qual considera que a interação de fatores relacionados ao agente etiológico - virulência, circulação de mais de um sorotipo, hiperendemicidade -, ao hospedeiro - susceptibilidade, anticorpos prévios, raça, pois indivíduos da raça negra raramente são notificados com FHD/SCD - e ao vetor - elevados níveis de infestação -, seriam os responsáveis pelo aparecimento de grandes epidemias com aumento da prevalência do Dengue Hemorrágico.

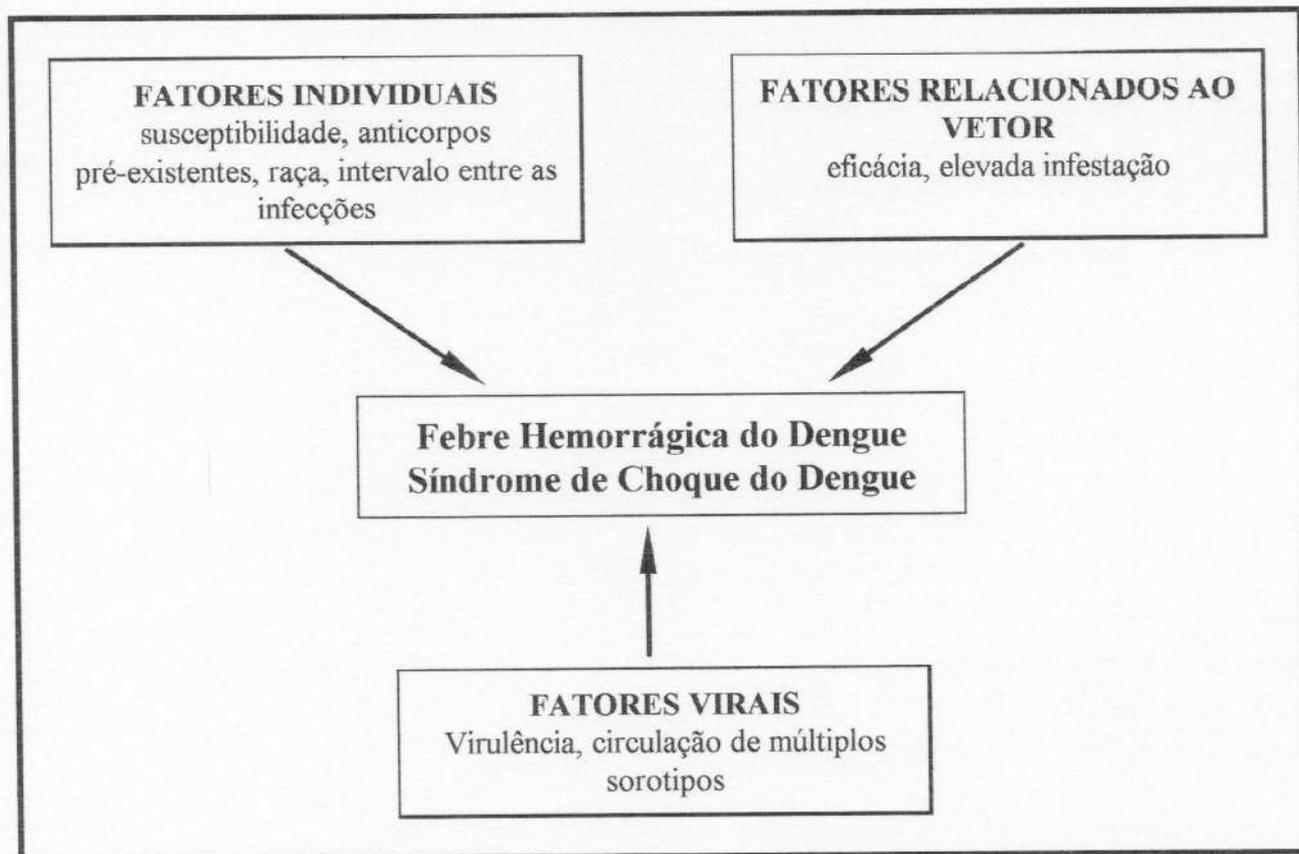


Figura 3. Modelo multicausal de fatores relacionados ao agente etiológico, segundo KOURI *et al* (1977).

1.6. Fatores imunológicos

Os dados imunopatológicos da Dengue e da Dengue Hemorrágica, estão ligados à existência na natureza de quatro tipos de dengue sorologicamente relacionados (WESTWAY *et al*, 1985; DeMADRID & PORTERFIELD, 1986). Indivíduos infectados com um sorotipo apresentam imunidade por toda a vida, para reinfecção pelo mesmo sorotipo. Mas são susceptíveis à infecção por um sorotipo diferente, após um pequeno período de proteção cruzada (SABIN,

1952). Tanto a Dengue como a Dengue Hemorrágica têm sido documentadas somente em indivíduos com uma segunda infecção; mas não com terceira ou quarta (HALSTEAD, 1988).

1.7. Proteínas estruturais do vírus da Dengue

A proteína C presente na partícula viral é pequena (PM 12 - 14kDa). Cópias múltiplas desta proteína associadas com RNA viral, formam o nucleocapsídeo dos flavivírus e pode ser encontrada em diferentes formas (RICE & COLS, 1986; MARKOFF, 1989).

A proteína E, do envelope, é a maior proteína estrutural da partícula viral, com um peso molecular de 53 a 58 kDa. Esta proteína é importante em diversas atividades biológicas incluindo montagem do vírus, fusão celular, indução de anticorpos neutralizantes (imunidade protetora), produção de anticorpos que inibem a aglutinação de eritrócitos e é um dos antígenos mais importantes para diagnóstico (HEINZ, 1986; SMITH & WRIGHT, 1985). Anticorpos monoclonais (MAbs), específicos para proteína E, são capazes de proteger camundongos de uma infecção por dengue (KAUFMAN & COLS, 1987).

A glicoproteína NS, pode ter um papel importante na resposta imune para infecção por vírus dengue, uma vez que a imunização passiva ou ativa

protegeu camundongos contra o desafio do vírus letal (SCHLESINGER & COLS, 1987). As glicoproteínas E e NS parecem ser os antígenos mais prováveis para o desenvolvimento de uma vacina (MASON & COLS, 1986; SPEIGHT WESTWAY, 1989).

NS₅ (PM 103 a 105 kDa) é a maior proteína viral e mais conservada entre os flavivírus, possuindo estrutura básica e com ausência de sequência hidrofóbica longa (MANDL & COLS, 1989; CHAMBERS, 1990). Já a NS₃ é a segunda maior proteína do vírus (PM 68 a 70 kDa) e tem um papel importante na replicação viral. (MANDL & COLS, 1989; RICE & COLS, 1990).

1.8. Diagnóstico laboratorial

Basicamente 4 testes sorológicos têm sido usados para diagnóstico de infecção pelo vírus dengue:

- Inibição da hemaglutinação (HI) (CLARK & CASALS, 1958);
- Fixação do complemento (CF) (ROSEN & GUBLER, 1974);
- Teste de Neutralização (NT) (RUSSEL & COLS, 1972);
- MAC-ELISA (KUNO & COLS, 1987).

A interpretação de um teste sorológico pode ser, na maioria das vezes, difícil, pois anticorpos anti-flavivírus podem apresentar reações cruzadas. (MONATH, 1990)

O MAC-ELISA é o teste sorológico mais utilizado é o mais recomendado, pois requer somente uma amostra de soro e detecta imunoglobulinas da classe IgM, que indicam infecção recente. No entanto este teste, dependendo do tipo de conjugado utilizado, distingue apenas o complexo dengue, não sendo possível identificar o tipo específico, nem infecções simultâneas por mais de um flavivírus (RACE, 1979; TESH, 1979; OPAS, 1994).

O teste HI, é teste mais antigo e é frequentemente utilizado como teste de regência, detecta determinantes antigênicos grupo-reativos em vários tecidos, o de FC tem uma especificidade aceitável, já sua sensibilidade é muito baixa, e o teste de NT é considerado tipo específico. O teste de NT é usado, também para a identificação de vírus e definição dos subgrupos intimamente relacionados (CALISHER & COLS, 1989)

A técnica de “*Western-blotting*” para caracterização de anticorpos contra proteínas do vírus dengue tem sido muito empregada, pois detecta ao mesmo tempo respostas contra proteínas estruturais e não-estruturais do vírus (CHURDBOONCHAT et al, 1988; WINKLER et al, 1988; FEIGHNY et al, 1992; PRYOR & WRIGHT, 1994).

O teste de RT-PCR (“Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction”) têm sido utilizado para detecção do RNA viral em muitos sistemas. Consiste na identificação do RNA viral no soro sangüíneo humano, amostras de tecidos e até mesmo no mosquito vetor (DEUBEL, 1997; GUZMAN & KOURI, 1996; LANCIOTTI et al, 1992).

O teste PanBio Dengue Duo, teste de captura de IgG e IgM através do ELISA, é um teste sorológico que oferece vantagens sobre o teste de HI, para o diagnóstico da Dengue. Se difere do HI por não ser preciso usar acetona no tratamento do soro. Além disso, a diferenciação entre infecção primária e secundária pode ser feita com apenas uma diluição do soro e não uma série.

No PanBio, IgG e IgM são determinados em poços separados em uma mesma placa de ensaio. Geralmente pode ser encontrado IgM em soros de pacientes após 3 a 5 dias do início dos sintomas, sendo que esses anticorpos podem persistir ainda por aproximadamente 60 dias. A infecção secundária é caracterizada por altos níveis de IgG, cuja elevação pode ser evidenciada já no segundo dia de infecção.

Anticorpos das classe IgG e IgM, quando presentes, se combinam com anticorpos contra IgG-Humana e IgM-Humana aderidas em poços da placa B

(Placa de ensaio). Imediatamente, o conjugado (anticorpo monoclonal contra dengue marcado com peroxidase) é adicionado à placa “A”, previamente sensibilizada com antígenos da Dengue tipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. O resíduo de soro é lavado da placa de ensaio e o complexo antígeno-conjugado é transferido da placa de antígeno “A” para a placa de ensaio “B”. Após a incubação, a placa de ensaio é lavada e acrescenta-se TMB com água oxigenada. O substrato é hidrolisado pela peroxidase e o cromógeno muda da cor amarela para o azul. Após a interrupção da reação com solução ácida, o TMB muda para o amarelo. A intensidade de cor é diretamente relacionada com a concentração de anticorpos IgG e IgM.

2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- A) Estabelecer comparações entre os testes de captura de anticorpos, Dengue Duo PanBio e Mac-ELISA.

- B) Determinar o perfil de proteínas dos sorotipos DEN-1 e DEN-2 do vírus da Dengue, através do teste "*Western Blotting*".

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras de soro

Casuística

Foram estudadas amostras de soros humanos enviadas ao Laboratório de Imunologia da UFU, pela Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia-MG, para serem testados pelo teste Mac-ELISA. Cada uma dessas amostras vieram acompanhadas de uma ficha epidemiológica do paciente (anexo).

3.2. Obtenção dos antígenos DEN-1 e DEN-2

Os antígenos DEN-1 e DEN-2 liofilizados, e soros controles negativos e positivos foram obtidos do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.

3.3. Mac-ELISA

Para o teste Mac-ELISA, foram utilizadas placas de poliestireno (DINEX, Technologies Inc.) com 96 poços. A sensibilização das placas foi realizada com 50 µl de anticorpo anti-IgM (cadeia µ, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) na concentração 1:200, por 18 horas a 4°C. Após esse período as placas foram lavadas 5 vezes com PBS (Salina Tamponada com Fosfato) e fez-se um bloqueio com 100 µl de BSA (Soro-Albumina Bovina) a 4%, por 30 minutos em temperatura ambiente (TA). A amostra de soro (50 µl) foi testada em

duplicata na diluição de 1:40 em PBS acrescido de SEN (Soro Equino Normal) a 5%, por 30 minutos em TA. Em cada placa foram reservados 2 poços para controle negativo e 2 para controles positivos. Após esse período acrescentou-se os antígenos DEN-1 e DEN-2 na diluição 1:30 em PBS acrescido de SEN 5% e incubou-se a reação por 18h a 4°C. Em seguida foi adicionado o conjugado anti-IgG Humana Peroxidase (Jackson Immuno Research) na diluição de 1:4000 em PBS acrescido de SEN 5%. E outra incubação durante 1 hora a 37° C. O substrato utilizado foi do “kit” ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) por 30 minutos a 37°C. A leitura da reação foi realizada no leitor de placas Titertek Multiskan Plus MK11, utilizando filtro de 405nm. E a classificação das amostras para cada grupo foi feita mediante comparação com os controles negativos e positivos.

3.4. Grupos de Soros

Foram selecionadas 40 amostras de soros, assim classificadas de acordo com o Mac-ELISA realizado em 4 grupos de 10:

Tabela 1: Subdivisão das 40 amostras de soros selecionados.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<i>D1: Não Reativos</i>	<i>D1: Reativos</i>	<i>D1: Reativos</i>	<i>D1: Fracamente reativos</i>
<i>D2: Não Reativos</i>	<i>D2: Reativos</i>	<i>D2: Fracamente reativos</i>	<i>D2: Reativos</i>

3.5. PanBio

Na placa A, pré-sensibilizada pelo fabricante com os 4 sorotipos da Dengue, foram adicionados 125 µl do conjugado HRP em cada poço (proveniente do “kit”). E incubada por 60 minutos a temperatura ambiente.

Na placa B, previamente sensibilizada pelo fabricante, metade com anti-IgG e a outra metade com anti-IgM) os 5 primeiros poços foram reservados para controles, sendo: 1º) Neutro, somente o diluente do soro; 2º e 3º) controles negativo e positivo; e, 4º e 5º) Controles para IgG e IgM. O restante dos poços foram utilizados para o soro diluído; que foi de 1:100 em Tampão Tris Tamponado com Salina. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C. Com 10 minutos da adição do conjugado na placa A, 100 µl das amostras de soro e controles foram adicionados a cada poço da placa B. E incubada a 37°C por 60 minutos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 4. Esquema da Placa B. Poços sensibilizados com anti-IgM Humana em rosa, e poços sensibilizados com anti-IgG Humana em verde.

Após a incubação, fez-se um ciclo de 5 lavagens com tampão de lavagem, fornecido pelo fabricante do “kit”. Retirou-se 100 µl do complexo antígeno-conjugado da placa A, e transferiu-se para os poços correspondentes da placa B, seguido de incubação a 37°C por 60 minutos. Novamente foi feito mais 5 lavagens e adicionado a cada poço 100 µl de TMB (Tetrametilbenzidina) e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Tempo necessário para a reação se processar, passando o conteúdo para a cor azul. Passado os 10 minutos, foi colocado 100 µl da solução de parada da reação (Ácido Fosfórico 1M). Novamente o conteúdo muda de cor passando para o amarelo. A leitura foi realizada no leitor de placas Titertek Multiskan Plus MK11, utilizando filtro 570nm.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil protéico dos sorotipos da Dengue, DEN-1 e DEN-2 foi analisado pela técnica de “Western Blotting”. Para isto, cada amostra clínica foi submetida separadamente a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, segundo Laemmli (1970).

O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl 0,375M (pH 8,8); SDS (Sulfato Dodecil de Sódio) a 0,1%; EDTA 2mM (Ácido Etileno Diamino Tetra Acético); TEMED (N,N,N,N - Tetrametil Etileno Diamino) a 1,125%; APS (Persulfato de Amônio) a 1,125% e Acrilamida:Bisacrilamida na

proporção de 30:0,8, respectivamente. Para o gel de empilhamento utilizou-se Tris-HCl 0,125M pH 6,8; SDS a 0,1%; EDTA 2mM, TEMED a 0,125%; APS a 0,125% e Acrilamida:Bisacrilamida a 5%. Os reagentes para SDS-PAGE foram obtidos dos seguintes fornecedores: Tris e SDS (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA); EDTA (Quimibrás Ind. Químicas AS. Rio de Janeiro - RJ, Brasil); Bisacrilamida, TEMED e APS (Pharmacia - LKB, Bromma, Suécia). A solução do gel de separação foi vertida cuidadosamente para a cavidade da placa previamente montada de maneira a evitar a formação de bolhas e o vazamento, sendo acrescentado uma camada de Butanol para evitar a sua polimerização em presença de oxigênio. Após a polimerização do gel de separação, o butanol foi descartado e adicionou-se o gel de empilhamento e o pente para formação dos poços de aplicação das amostras. As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo o tampão Tris-glicina 0,025 pH 8,3. Amostras dos antígenos, DEN-1 ou DEN-2 foram diluídas volume a volume em tampão da amostra (Tris-HCl 0,1M; pH 6,8; SDS a 4%; azul de bromofenol a 0,2%; glicerol a 20%), sem β -mercaptoetanol (agente redutor), e submetidas a um aquecimento de 100°C em banho-Maria por 3 minutos. Estas amostras foram aplicadas no poço do gel, paralelamente a amostras contendo proteínas de pesos moleculares conhecidos (GibcoBRL). A corrente elétrica inicial, da corrida foi de 20 mA sendo aumentada para 30 mA quando as proteínas atingiram a linha correspondente ao início do gel de separação.

3.7. Western-Blotting

Ao final da migração eletroforética das proteínas, realizou-se a transferência destas para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (Protran[®] Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), segundo as técnicas descritas por Towbin *et al* (1979). Foi preparado um 'sandwich' utilizando folhas de papel filtro recortadas na mesma medida do gel, membrana de nitrocelulose e o gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas, evitou-se formação de bolhas, e a transferência foi efetuada em sistema semi-úmido, utilizando o equipamento Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia - LKB, Bromma, Suécia).

As folhas de papel de filtro e a membrana de nitrocelulose foram umedecidas em tampão de transferência. A este material foi aplicado uma corrente de 0,8 mA por cm² do 'sandwich', pelo período de duas horas. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau a 0,5% em Ácido Acético a 1%, a fim de verificar a eficiência da transferência.

As membranas foram cortadas em fitas de 2 a 3 mm, e seus sítios ativos foram bloqueados com uma solução de PBS a 0,05% de Tween 20, adicionada de 5% de leite desnatado (PBS-T Molico 0,05%), durante duas horas. As fitas foram numeradas e acondicionadas em placas de poliuretano com 8 canaletas com capacidade de 0,5 ml cada.

Um volume de 500 μ l das amostras, em duplicata, de soro humano diluídas a 1:20 em PBS-T Molico 0,05%, foi adicionado em cada canaleta com a

fita de nitrocelulose. Estas foram incubadas durante 18 horas a 4°C sob agitação lenta e constante.

Após a incubação realizou-se o primeiro ciclo de lavagens, ou seja, 6 vezes por 5 minutos com PBS-T 0,05%. Após a lavagem, colocou-se o conjugado anti-IgG Humana e anti-IgM Humana produzidas em cabra, ligada a peroxidase (Sigma Chem. Co. St Louis - MO, USA). Novamente as fitas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. Passado o tempo de incubação, fez-se 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T 0,05% e outras 3 apenas com PBS 1x durante 5 minutos.

A reação foi revelada com uma solução de 10 mg de DAB (3,3-Diaminobenzidina, Sigma Chem. Co. St Louis - MO, USA) diluído em 30 ml de PBS e 500 µl de solução de H₂O₂ a 30%. Com o surgimento das bandas de cor marrom a reação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.8. Análise Estatística

Na comparação entre o teste de captura PanBio e Mac Elisa, foi realizado o teste “t” de *Student* para duas amostras presumindo variâncias equivalentes. Utilizando a média e o desvio padrão dos grupos associados dois a dois. O “software” MicroSoft Excel 98 foi utilizado para obtenção dos parâmetros comparativos.

Para a análise estatística do teste “*Western Blotting*” foi considerado primeiramente o número total de frações antigênicas encontradas. Em seguida, o perfil protéico foi caracterizado analisando-se a frequência de cada proteína entre as amostras estudadas.

4- RESULTADOS

Os resultados obtidos dos três testes estão descritos a seguir.

4.1 MAC-Elisa

Realizados os testes Mac-Elisa, foi feita a seleção dos soros baseados em seus resultados.

A tabela 2 mostra o resultado das absorvâncias pelo teste sorológico MacELISA das 10 amostras clínicas selecionadas para o grupo 1, testadas com os sorotipos DEN-1 e DEN-2, com seu respectivo número de controle interno. Cada uma destas amostras foram testadas em duplicatas, obtendo a média e desvio padrão para cada e construído o gráfico (Figura 5).

Grupo I : D1: Não Reativos.
D2: Não reativos.

Tabela 2: Valores das absorvâncias pelo Teste MAC-Elisa (405 nm) para as amostras de soro (em duplicata) do Grupo 1.
DP: Desvio Padrão.

Nº soro	D1		Média	DP D1	D2		Média	DP D2
1699	0,286	0,311	0,299	0,018	0,343	0,323	0,333	0,014
1696	0,339	0,341	0,340	0,001	0,252	0,329	0,291	0,054
1695	0,336	0,288	0,312	0,034	0,326	0,28	0,303	0,033
1693	0,386	0,352	0,369	0,024	0,271	0,278	0,275	0,005
1688	0,310	0,276	0,293	0,024	0,351	0,338	0,345	0,009
1686	0,307	0,460	0,384	0,108	0,813	0,722	0,768	0,064
1683	0,305	0,231	0,268	0,052	0,318	0,296	0,307	0,016
1681	0,266	0,240	0,253	0,018	0,209	0,26	0,235	0,036
1676	0,270	0,401	0,336	0,093	0,393	0,403	0,398	0,007
1675	0,267	0,448	0,358	0,128	0,284	0,208	0,246	0,054

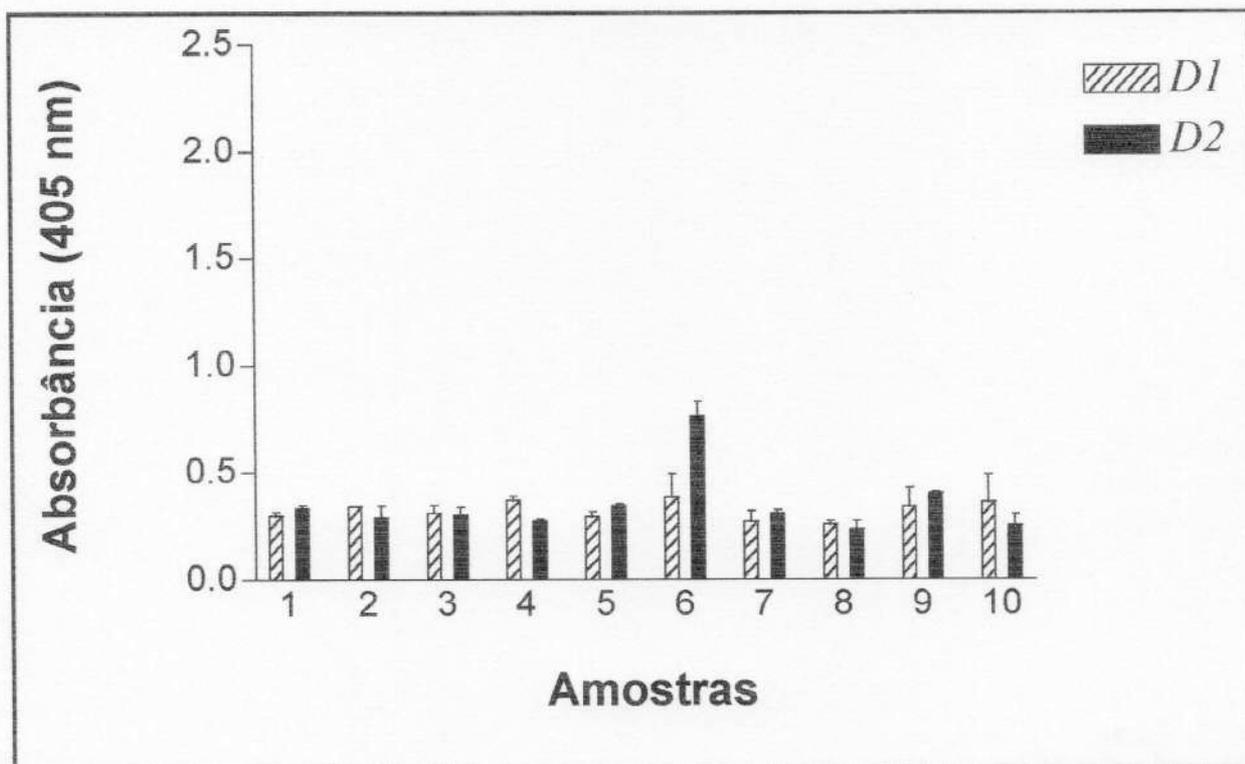


Figura 5. Valores médios das absorbâncias, com o Desvio Padrão de cada amostra de soro do Grupo 1.

Os valores das absorbâncias, em duplicatas, para as amostras clínicas selecionadas para o grupo 2 estão apresentados na tabela 3. Para o qual foi construído o gráfico com os valores médios e desvios padrão (Figura 6).

Grupo II : D1: Reativos.
D2: Reativos.

**Tabela 3: Valores das absorvâncias pelo Teste MAC-Elisa (405 nm) para as amostras de soro (em duplicata) do Grupo 2.
DP: Desvio Padrão.**

Nº soro	D1		Média	DP D1	D2		Média	DP D2
1704	0,839	0,799	0,819	0,028	2,441	2,327	2,384	0,081
1701	2,034	2,179	2,107	0,103	1,487	1,956	1,722	0,332
1700	0,492	0,387	0,440	0,074	1,694	0,643	1,169	0,743
1697	0,756	0,765	0,761	0,006	1,568	1,610	1,589	0,030
1694	0,799	0,735	0,767	0,045	1,311	1,460	1,386	0,105
1691	0,982	0,961	0,972	0,015	1,000	0,932	0,966	0,048
1689	1,354	1,675	1,515	0,227	0,957	1,081	1,019	0,088
1684	0,667	0,614	0,641	0,037	0,689	0,689	0,689	0,000
1682	0,816	0,849	0,833	0,023	0,553	0,583	0,568	0,021
1674	0,379	0,633	0,506	0,180	1,144	1,441	1,293	0,210

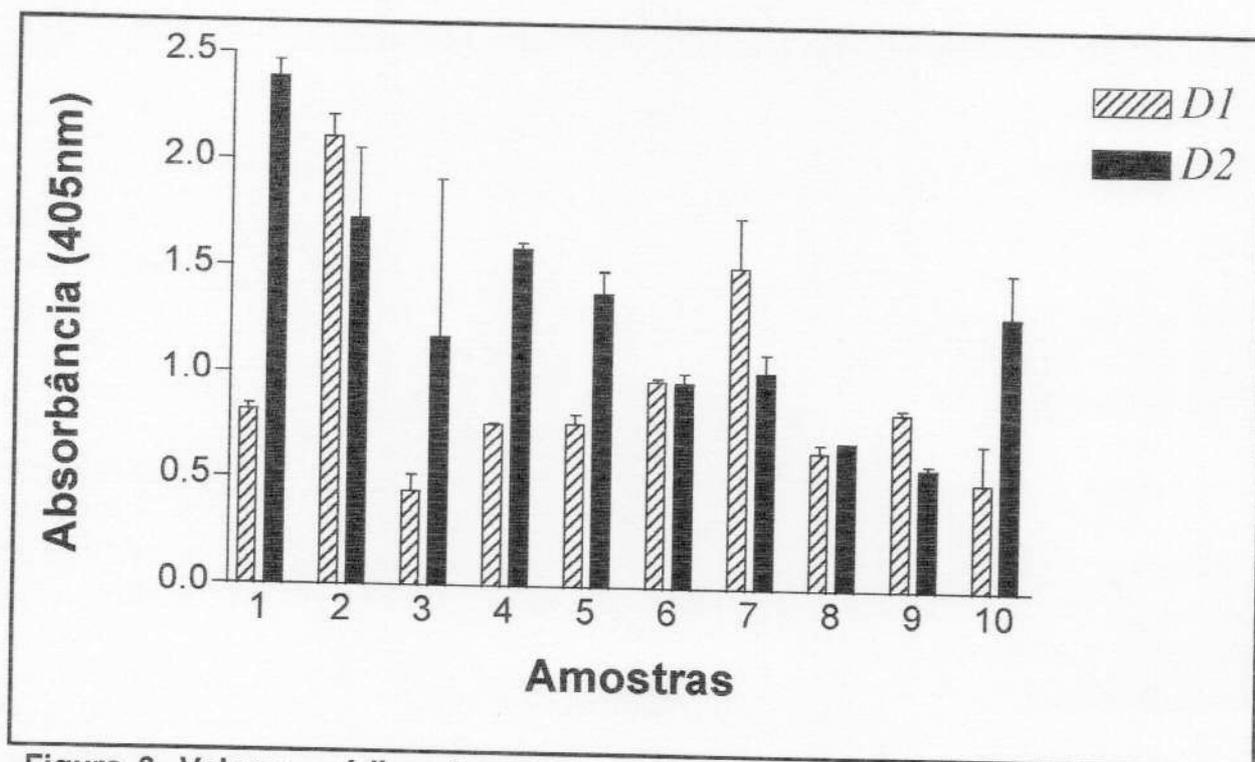


Figura 6. Valores médios das absorbâncias, com o Desvio Padrão de cada amostra de soro do Grupo 2.

O mesmo procedimento foi realizado na seleção de amostras clínicas para os grupos 3 e 4 (Tabelas 4 e 5, respectivamente). Obtendo assim, gráficos com os valores médios e desvios padrão de cada grupo (Figura 7 e 8, respectivamente).

Grupo III: D1: Reativos.
D2: Fracamente Reativos

Tabela 4: Valores das absorvâncias pelo Teste MAC-Elisa (405 nm) para as amostras de soro (em duplicata) do Grupo 3.
DP: Desvio Padrão.

Nº soro	D1		Média	DP D1	D2		Média	DP D2
1685	0,968	1,086	1,027	0,083	0,391	0,458	0,425	0,047
1661	1,288	1,734	1,511	0,315	0,784	0,604	0,694	0,127
1599	1,633	1,725	1,679	0,065	0,489	0,663	0,576	0,123
1593	1,593	1,619	1,606	0,018	0,496	0,585	0,541	0,063
1667	2,205	1,714	1,960	0,347	0,564	0,607	0,586	0,030
1087	0,900	0,370	0,635	0,375	0,315	0,278	0,297	0,026
982	0,223	0,227	0,225	0,003	0,308	0,368	0,338	0,042
929	0,668	0,684	0,676	0,011	0,288	0,295	0,292	0,005
906	0,869	0,999	0,934	0,092	0,327	0,331	0,329	0,003
900	0,677	0,686	0,682	0,006	0,387	0,376	0,382	0,008

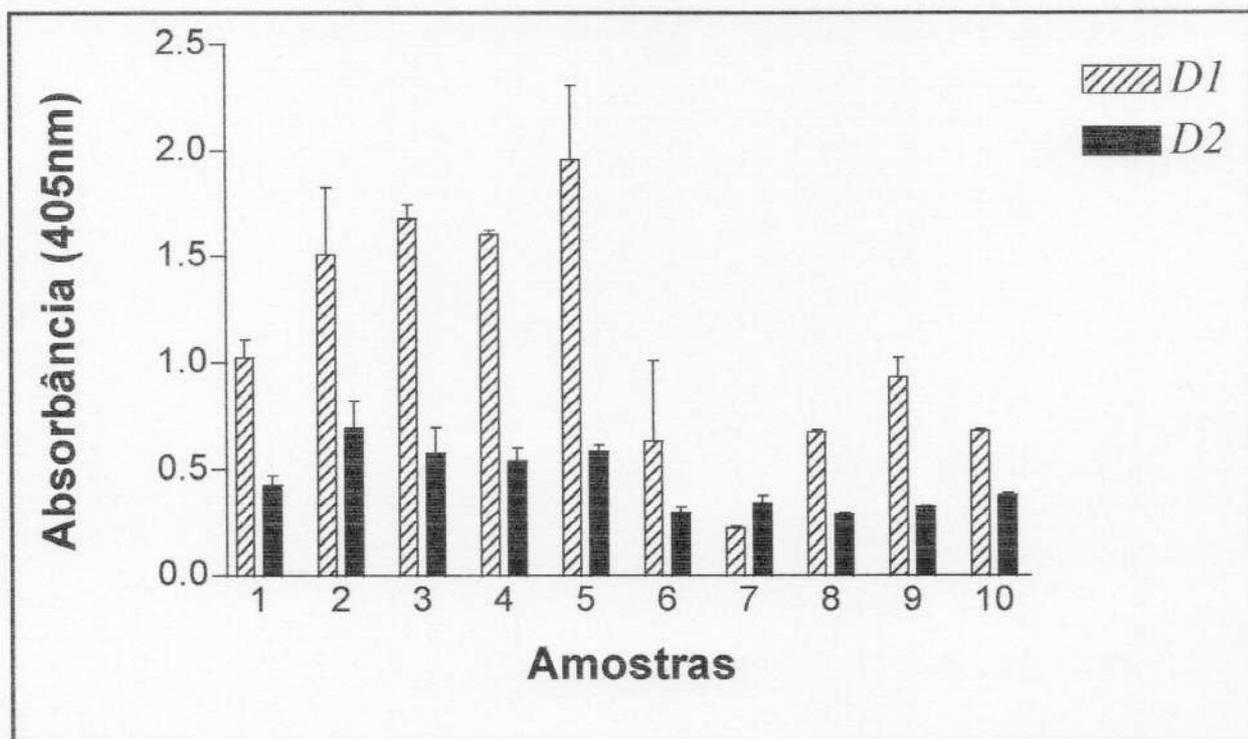


Figura 7. Valores médios das absorvâncias, com o Desvio Padrão de cada amostra de soro do Grupo 3.

Grupo IV: D1: Fracamente Reativos.
D2: Reativos.

Tabela 5: Valores das absorvâncias pelo Teste MAC-Elisa (405 nm) para as amostras de soro (em duplicata) do Grupo 4.
DP: Desvio Padrão.

Nº soro	D1		Média	DP D1	D2		Média	DP D2
1698	0,319	0,481	0,400	0,115	1,216	1,064	1,140	0,107
1687	0,442	0,519	0,481	0,054	1,493	1,631	1,562	0,098
1605	0,582	0,459	0,521	0,087	1,61	1,31	1,460	0,212
1587	0,442	0,519	0,481	0,054	1,493	1,631	1,562	0,098
1577	0,568	0,448	0,508	0,085	1,222	1,248	1,235	0,018
1573	0,498	0,527	0,513	0,021	0,534	0,613	0,574	0,056
1702	0,38	0,463	0,422	0,059	0,429	0,508	0,469	0,056
1417	0,186	0,158	0,172	0,020	0,701	0,664	0,683	0,026
1338	0,425	0,391	0,408	0,024	2,165	2,225	2,195	0,042
1335	0,408	0,412	0,410	0,003	0,609	0,491	0,550	0,083

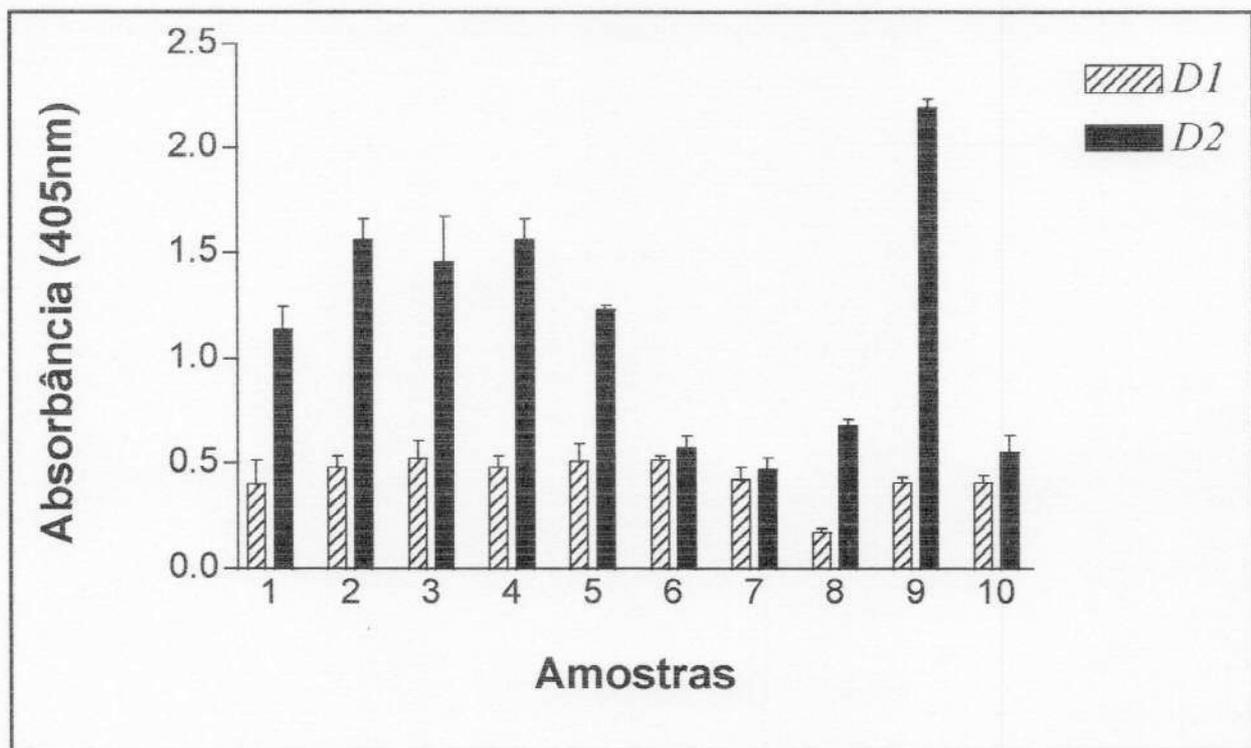


Figura 8. Valores médios das absorbâncias, com o Desvio Padrão de cada amostra de soro do Grupo 4.

4.2. PanBio

Após a realização do teste MacELISA, e feita a seleção dos soros, cada amostra em seus devidos grupos, foi submetida ao teste de captura de anticorpos IgG e IgM, pelo Dengue Duo-PanBio. Não tendo sido realizado em duplicata.

A tabela 6 mostra os valores das absorvâncias (usando filtro de 570nm) para cada amostra clínica do grupo 1, em seu respectivo número de controle interno. Onde foi construído um gráfico com estes valores (Figura 9). O que mostra não haver muita variação nos índices de IgG para IgM. Visto que este grupo, foi classificado como sendo Não Reativo para ambos.

Grupo I : D1: Não Reativos.
D2: Não reativos.

Tabela 6: Valores das absorvâncias pelo Teste PanBio Duo (570 nm) para as amostras de soro do Grupo 1.

Nº Soro	IgG	IgM
1699	0,156	0,209
1696	0,169	0,176
1695	0,182	0,177
1693	0,231	0,188
1688	0,207	0,189
1686	0,446	0,664
1683	0,277	0,173
1681	0,16	0,171
1676	0,301	0,446
1675	0,206	0,151

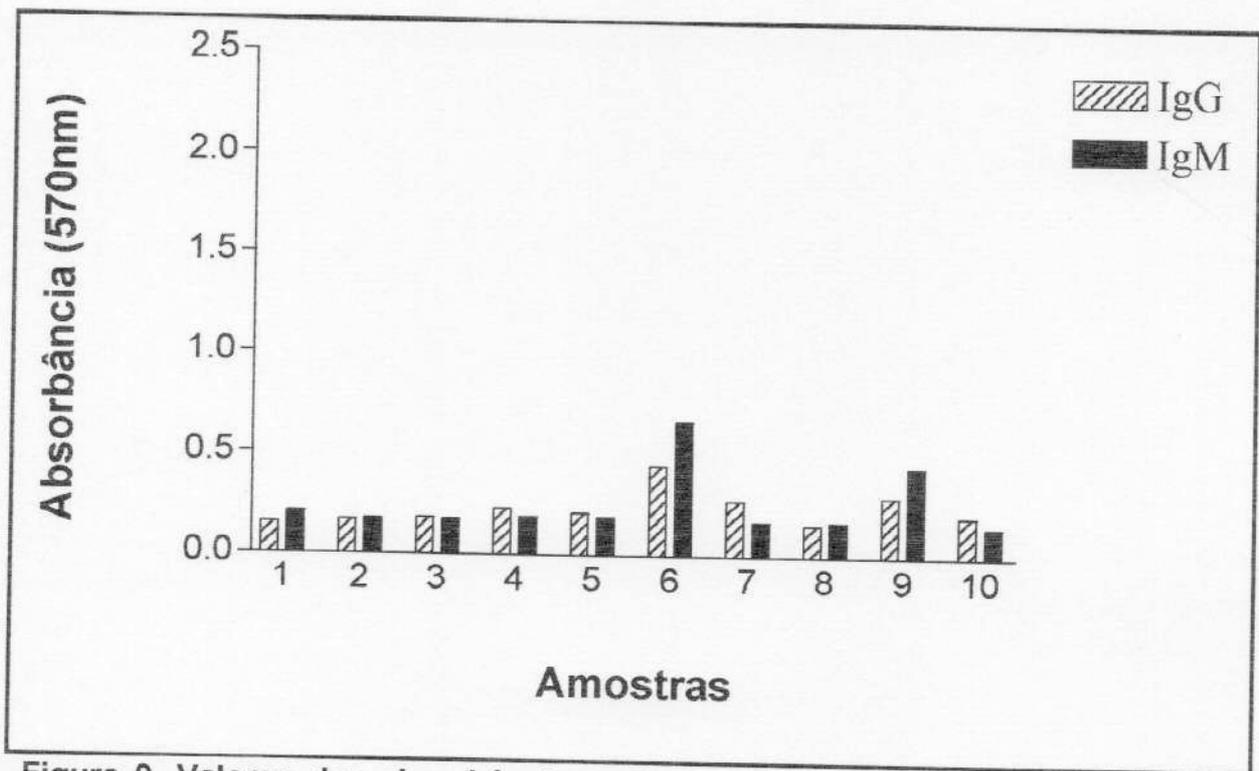


Figura 9. Valores das absorbâncias pelo Teste PanBio de cada amostra de soro do Grupo 1.

Os valores da leitura das absorbâncias das amostras clínicas do grupo 2, em filtro de 570 nm, para os anticorpos IgG e IgM, estão expressos na tabela 7. Onde o gráfico construído com estes valores (Figura 10), já revela haver uma variação nos índices de um anticorpo para o outro. Sendo 70% das amostras clínicas com valor de IgG maior que o de IgM (amostras 1, 2, 3, 5, 7, 8 e 9), e outros bem próximos entre si (amostras 6 e 10). Essas amostras clínicas foram classificadas como sendo Reativas para ambos anticorpos.

Grupo II : D1: Reativos.
D2: Reativos.

Tabela 7: Valores das absorbâncias pelo Teste PanBio Duo (570 nm) para as amostras do Grupo 2.

Nº Soro	IgG	IgM
1704	<i>0,874</i>	<i>0,537</i>
1701	<i>1,859</i>	<i>0,376</i>
1700	<i>1,197</i>	<i>0,498</i>
1697	<i>0,625</i>	<i>0,665</i>
1694	<i>0,926</i>	<i>0,544</i>
1691	<i>0,496</i>	<i>0,548</i>
1689	<i>1,099</i>	<i>0,601</i>
1684	<i>1,639</i>	<i>0,708</i>
1682	<i>1,064</i>	<i>0,675</i>
1674	<i>1,451</i>	<i>1,434</i>

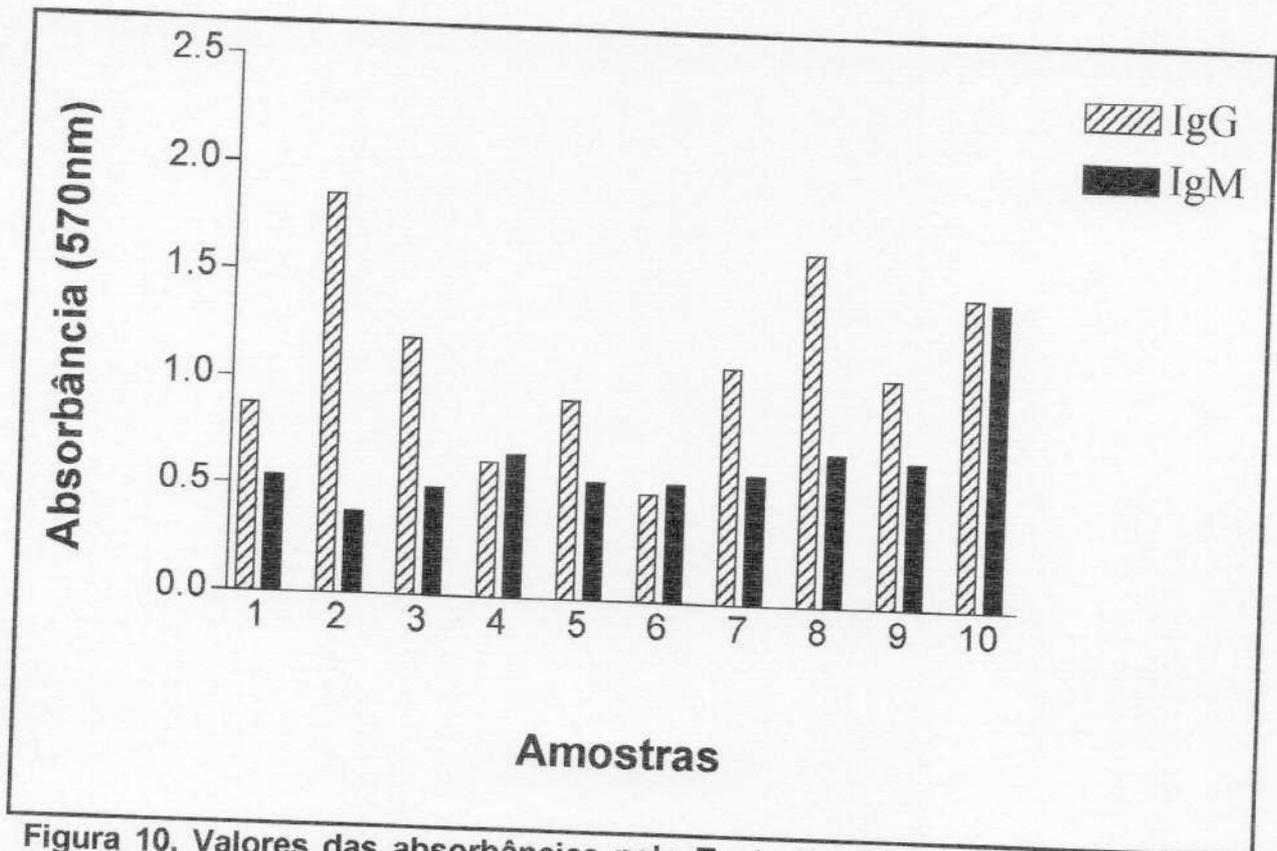


Figura 10. Valores das absorbâncias pelo Teste PanBio de cada amostra de soro do Grupo 2.

Já a tabela 8, mostra os valores das absorvâncias para as amostras do Grupo 3, para anticorpo IgG e IgM. Onde novamente 70% das amostras apresentaram índices de IgG maior do que IgM (amostras 1, 4, 5, 6, 7, 9 e 10). Tendo sido encontrado o contrário somente em 20% (amostras 3 e 8). Onde foi construído o gráfico da figura 11. A amostra clínica número 2, número de controle interno 1661, foi suficiente somente para o teste MacELISA.

Grupo III: D1: Reativos.
D2: Fracamente Reativos

Tabela 8: Valores das absorvâncias pelo Teste PanBio Duo (570 nm) para as amostras de soro do Grupo 3.

Nº Soro	IgG	IgM
1685	0,972	0,859
1661	ND	ND
1599	0,607	1,213
1593	0,590	0,482
1667	1,283	0,946
1087	1,013	0,356
982	0,781	0,454
929	0,255	0,523
906	0,970	0,841
900	0,663	0,423

ND: Não Disponível.

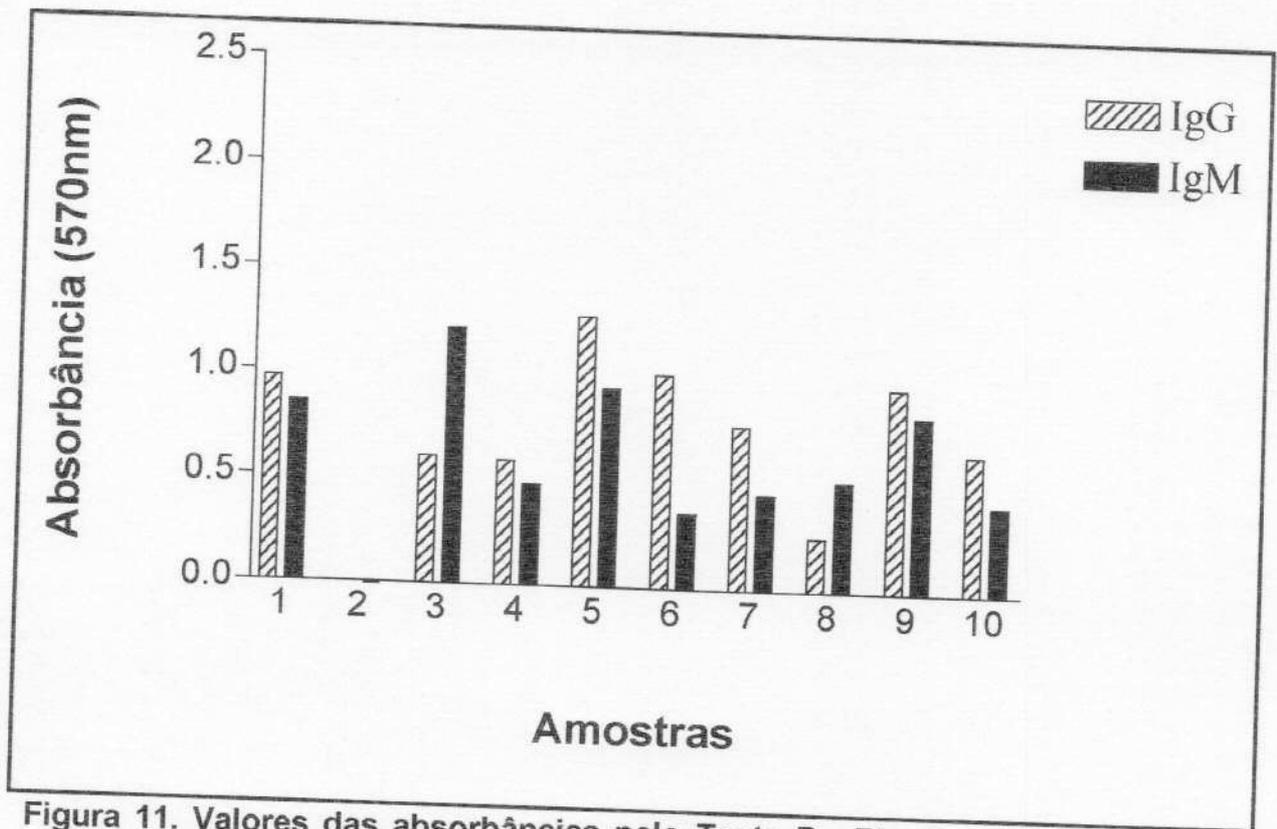


Figura 11. Valores das absorbâncias pelo Teste PanBio de cada amostra de soro do Grupo 3.

Em 70% das amostras do grupo 4, houve índices de IgG maiores que IgM, o que pode ser visto na tabela 9 e figura 12 (amostras 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10). Tendo sido encontrado duas amostras onde índices de IgM eram maiores que IgG (amostras 2 e 3). E uma única com valores para estes dois anticorpos bem próximos.

Grupo IV: D1: Fracamente Reativos.
D2: Reativos

Tabela 9: Valores das absorbâncias pelo Teste PanBio Duo (570 nm) para as amostras de soro do Grupo 4.

Nº Soro	IgG	IgM
1698	0,452	0,354
1697	0,576	0,732
1605	0,333	0,648
1587	1,111	0,402
1577	0,962	0,529
1573	0,432	0,337
1702	0,202	0,212
1417	0,768	0,517
1338	1,059	0,321
1335	0,973	0,600

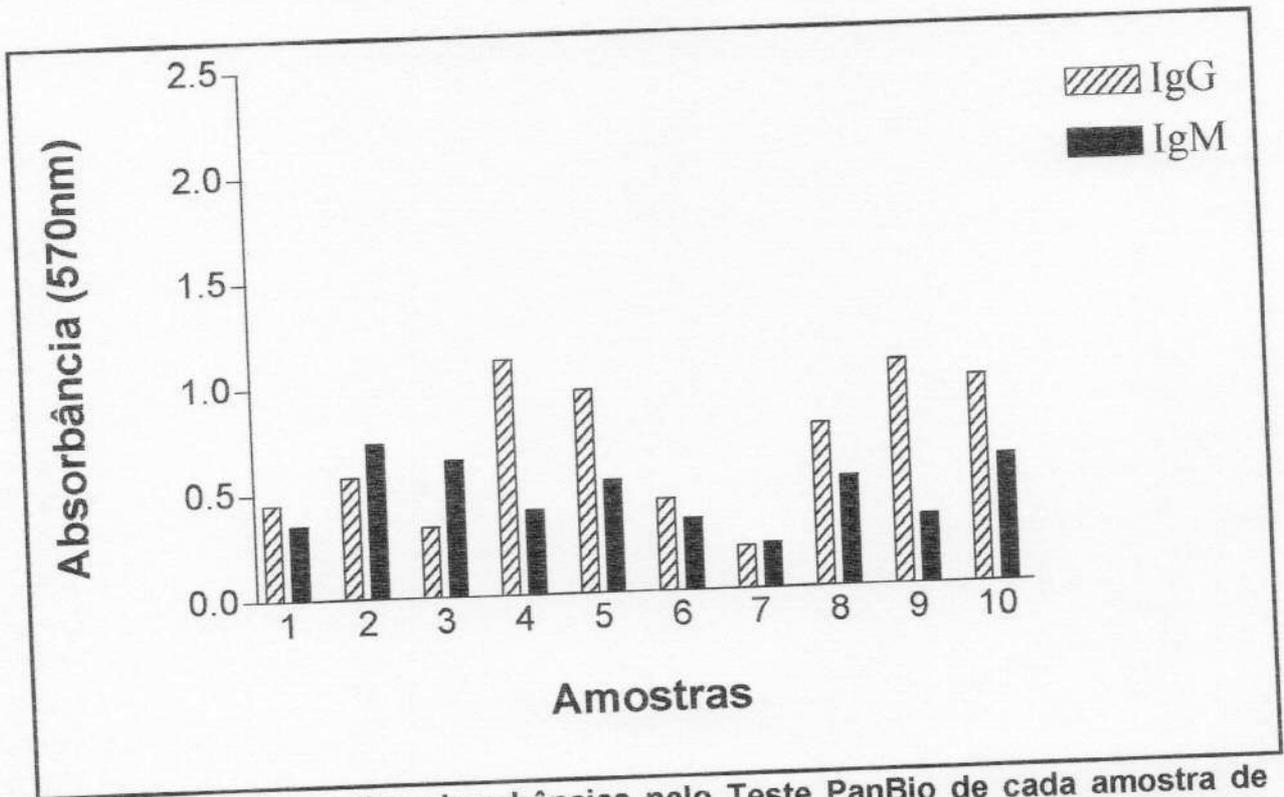


Figura 12. Valores das absorbâncias pelo Teste PanBio de cada amostra de soro do Grupo 4.

4.3 Análise Estatística

Tendo sido feito os testes sorológicos MacELISA e Dengue Duo-PanBio, extraiu-se o valor de P em teste bi-caudal, utilizando os valores médios e desvios padrão das absorbâncias, através do teste “t” de *Student*, presumindo duas amostras equivalentes, com índice de significância 0,05%.

As comparações foram realizadas comparando-se os valores entre testes e entre grupos. São eles:

4.3.1. Teste MacELISA entre sorotipos

Dos quatro testes MacELISA realizados, comparando os sorotipos DEN-1 e DEN-2, ambos de cada grupo separadamente, obteve-se os seguintes resultados:

Tabela 10: Valores médios e desvios padrão das absorbâncias dos Grupos 1, 2, 3 e 4, sorotipos DEN-1 e DEN-2, pelo teste MacELISA. E o valor de P bi-caudal obtido com estes.

GRUPO 1		
	DEN-1	DEN-2
Média	0,3212	0,3501
Desvio padrão	0,043	0,154
P = 0,575		
GRUPO 2		
	DEN-1	DEN-2
Média	0,9361	1,2785
Desvio padrão	0,506	0,532
P = 0,158		
GRUPO 3		
	DEN-1	DEN-2
Média	1,0935	0,446
Desvio padrão	0,564	0,142
P = 0,002		
GRUPO 4		
	DEN-1	DEN-2
Média	0,4316	1,143
Desvio padrão	0,102	0,568
P = 0,001		

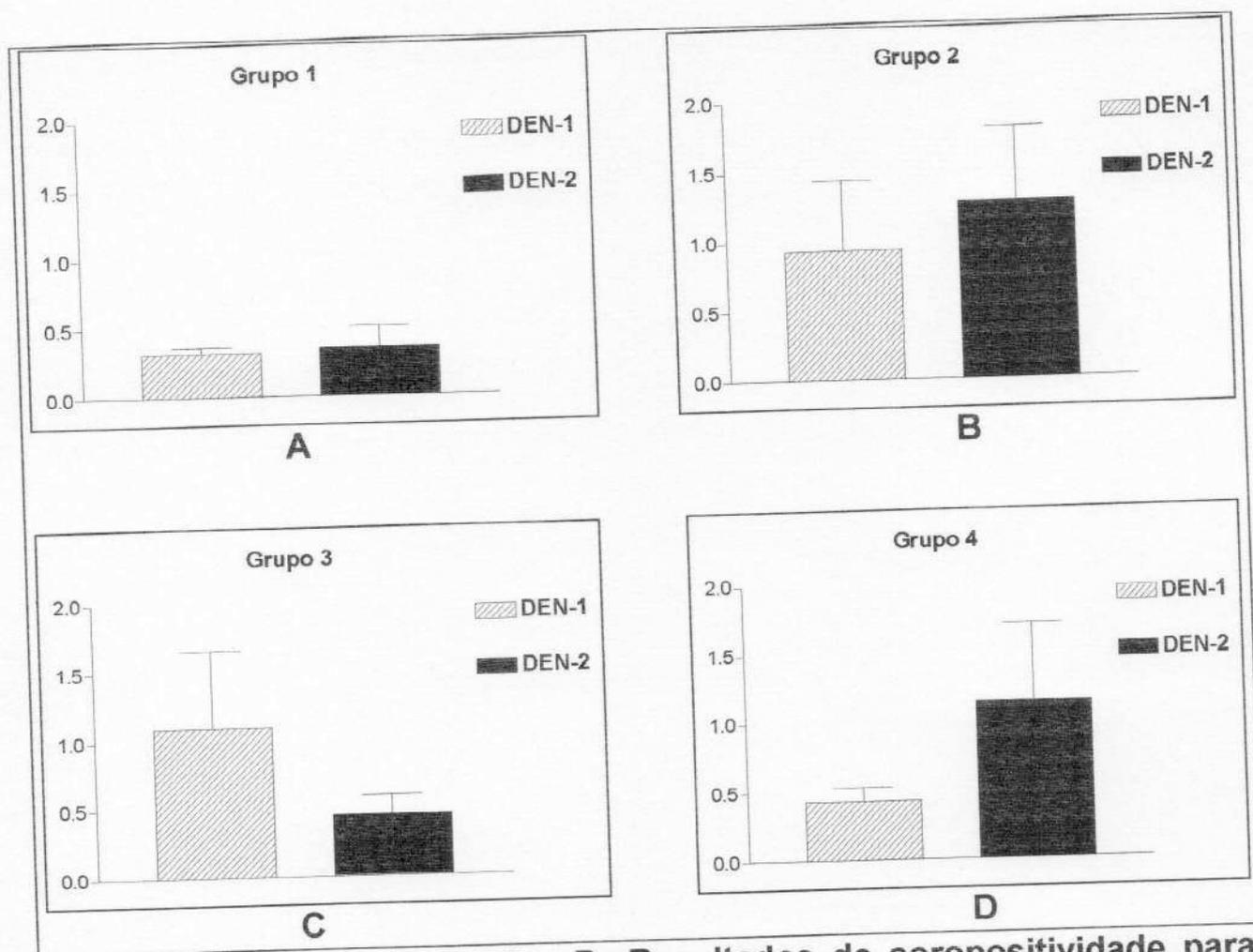


Figura 13: Gráficos A, B, C e D: Resultados de soropositividade para DEN-1 e DEN-2, detectados para os Grupos de 1 a 4 pelo MAC-ELISA - obtidos com o valor médio e desvio padrão das absorbâncias.

Comparando-se a reatividade entre os sorotipos DEN-1 e DEN-2 (Tabela 10, Figura 13), não houve diferenças estatísticas significativas quando se comparou as amostras do grupo 1 e 2 ($P > 0,05$) (Gráficos A e B; respectivamente). No entanto, as comparações entre DEN-1 e DEN-2 dos grupos 3 e 4 (Gráficos C e D; respectivamente), revelaram diferenças estatísticas significativas ($P = 0,002$ para Grupo 3 e $P=0,001$ para grupo 4).

4.3.2. Dengue Duo-PanBio entre antígenos

Dos quatro testes Dengue Duo-PanBio realizados, comparando os anticorpos IgG e IgM, ambos de cada grupo separadamente, obteve-se os seguintes resultados:

Tabela 11: Valores médios e desvios padrão das absorvâncias dos Grupos 1, 2, 3 e 4, antígenos IgG e IgM, pelo teste Dengue Duo-PanBio. E o valor de P bi-caudal obtido com estes.

GRUPO 1		
	IgG	IgM
Média	0,2335	0,2544
Desvio padrão	0,089	0,167
P = 0,731		
GRUPO 2		
	IgG	IgM
Média	1,123	0,6586
Desvio padrão	0,43	0,289
P = 0,01		
GRUPO 3		
	IgG	IgM
Média	0,792	0,677
Desvio padrão	0,302	0,295
P = 0,426		
GRUPO 4		
	IgG	IgM
Média	0,6868	0,4652
Desvio padrão	0,329	0,165
P = 0,07		

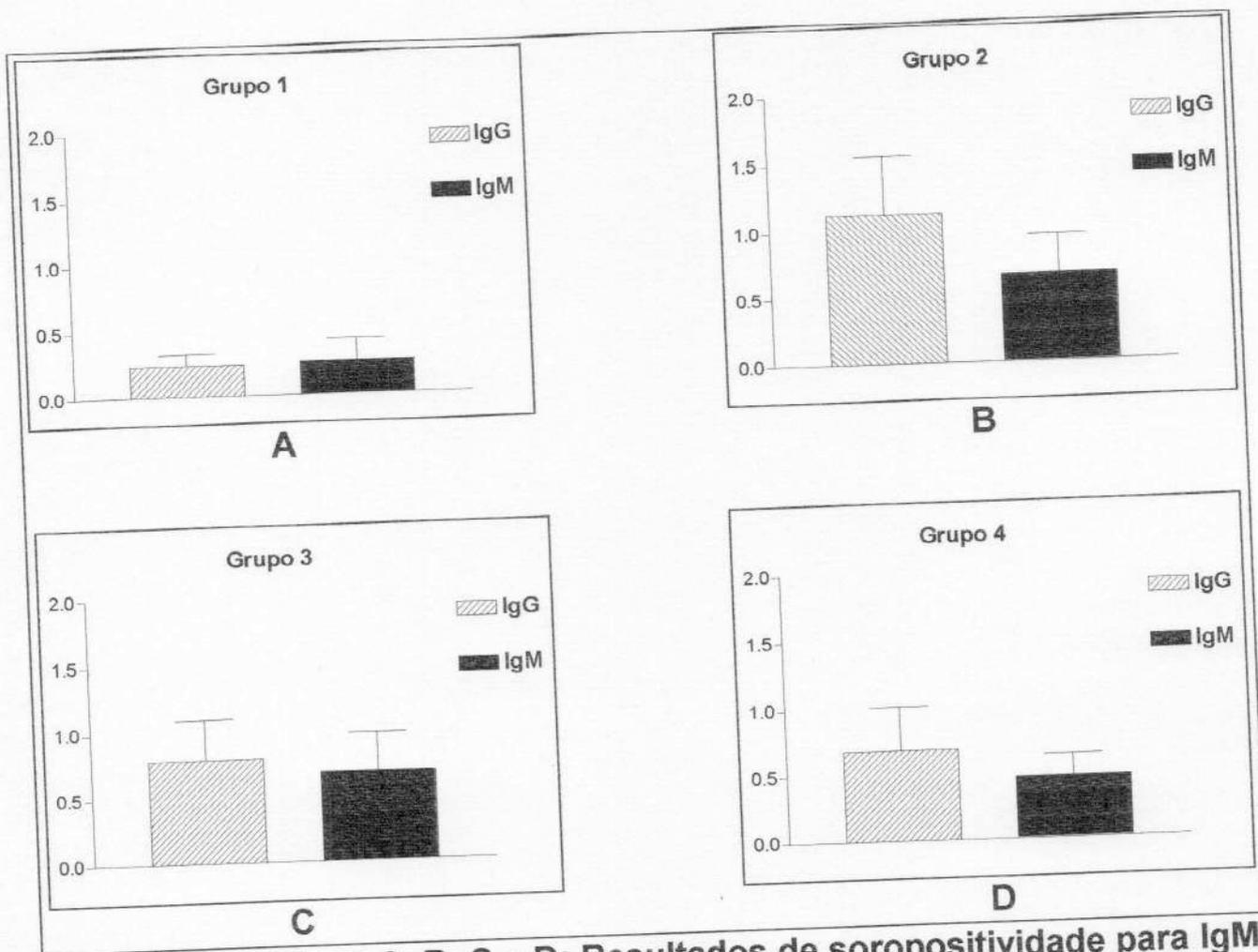


Figura 14: Gráficos A, B, C e D: Resultados de soropositividade para IgM e IgG, detectados para os Grupos de 1 a 4 - obtidos com o valor médio e desvio padrão das absorbâncias através do Dengue Duo-PANBIO.

Com relação ao teste PanBio, comparando-se a reatividade entre os anticorpos IgG e IgM (Tabela 11, Figura 14), não houve diferenças estatísticas significativas quando comparou-se as amostras dos grupos 1, 3 e 4 ($P > 0,05$) (Gráficos A, C e D; respectivamente). No entanto, as comparações entre IgG e IgM do grupo 2, houve diferenças estatísticas significativas (com $P < 0,05$) (Gráfico B).

4.3.3. Sorotipo DEN-1 comparado entre os grupos

A análise do sorotipo DEN-1 foi realizada cruzando os valores médios e desvios padrão entre os 4 grupos. Obtendo assim, os seguintes resultados:

Tabela 12: Valores médios e desvios padrão das absorbâncias nas comparações entre-grupos em relação ao sorotipo DEN-1.

SOROTIPO DEN-1		
	GRUPO 1	GRUPO 2
Média	0,3212	0,9361
Desvio padrão	0,043	0,5
P = 0,001		
	GRUPO 1	GRUPO 3
Média	0,3212	1,093
Desvio padrão	0,043	0,564
P = 0,0004		
	GRUPO 1	GRUPO 4
Média	0,3212	0,4316
Desvio padrão	0,043	0,102
P = 0,005		
	GRUPO 2	GRUPO 3
Média	0,9361	1,093
Desvio padrão	0,50	0,564
P = 0,51		
	GRUPO 2	GRUPO 4
Média	0,9361	0,4316
Desvio padrão	0,50	0,102
P = 0,006		
	GRUPO 3	GRUPO 4
Média	1,093	0,4316
Desvio padrão	0,564	0,102
P = 0,001		

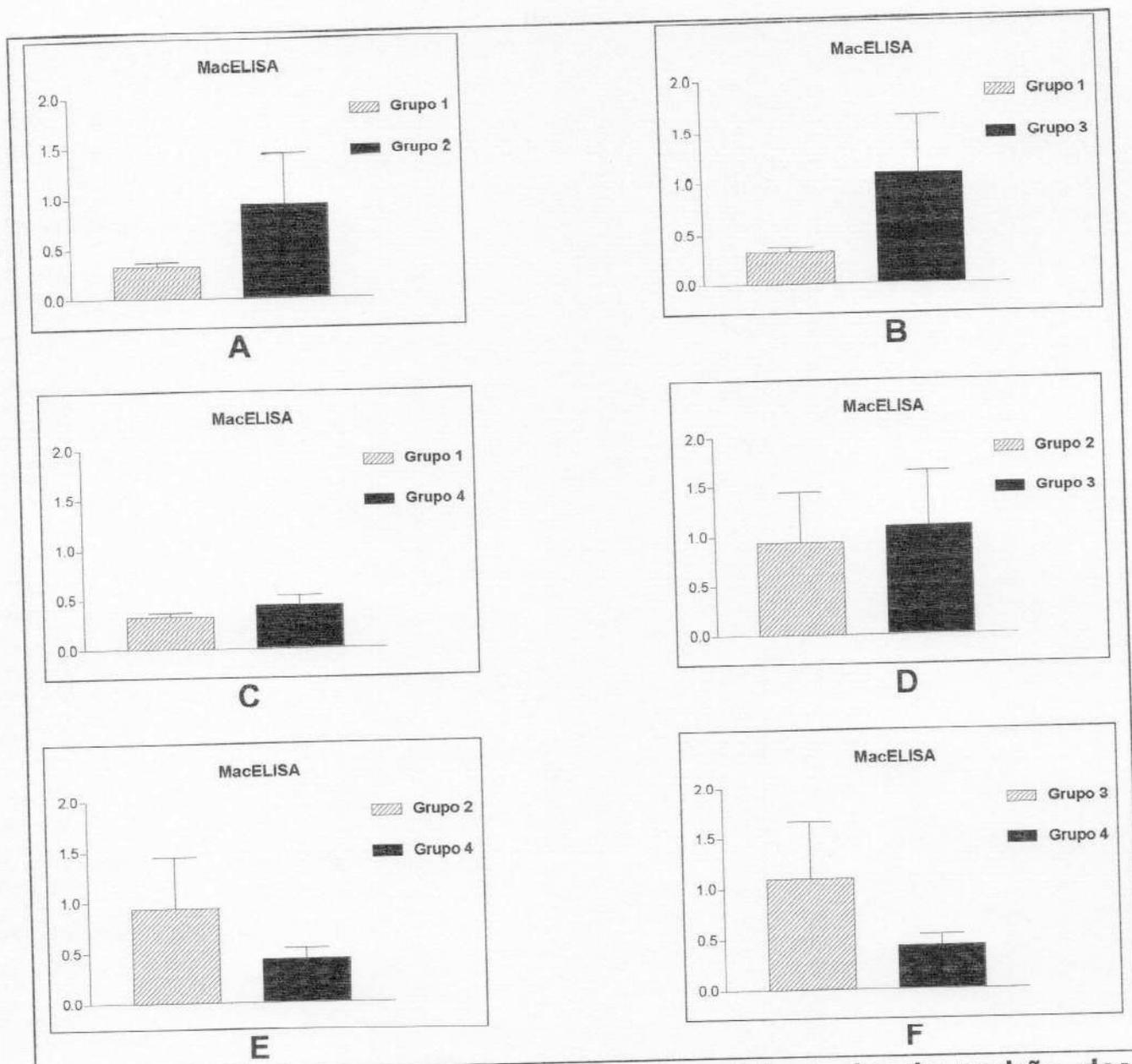


Figura 15: Gráficos obtidos com o valor médio e desvio padrão das absorbâncias através do MacELISA. Sorotipo DEN-1; entre os diferentes grupos de 1 a 4.

Com relação à reatividade ao sorotipo DEN-1 (Tabela 12, Figura 15), este mesmo teste evidenciou que somente as comparações entre os grupos 2 e 3, não foram significativas ($P > 0,05$) (Gráfico D). Todas as outras comparações intergrupos revelaram resultados significativos (P variando entre 0,0004 a 0,006).

4.3.4. Sorotipo DEN-2 comparado entre os grupos

A análise do sorotipo DEN-2 foi comparada cruzando os valores médios e desvio padrão entre os 4 grupos. Obtendo assim, os seguintes resultados:

Tabela 13: Valores médios e desvios padrão das absorbâncias nas comparações entre-grupos em relação ao sorotipo DEN-2.

SOROTIPO DEN-2		
	GRUPO 1	GRUPO 2
Média	0,3501	1,278
Desvio padrão	0,154	0,532
P = 0,00004		
	GRUPO 1	GRUPO 3
Média	0,3501	0,446
Desvio padrão	0,154	0,142
P = 0,166		
	GRUPO 1	GRUPO 4
Média	0,3501	1,143
Desvio padrão	0,154	0,568
P = 0,0004		
	GRUPO 2	GRUPO 3
Média	1,2785	0,446
Desvio padrão	0,5326	0,142
P = 0,0001		
	GRUPO 2	GRUPO 4
Média	1,2785	1,143
Desvio padrão	0,532	0,568
P = 0,58		
	Grupo 3	Grupo 4
Média	0,446	1,143
Desvio padrão	0,142	0,568
P = 0,001		

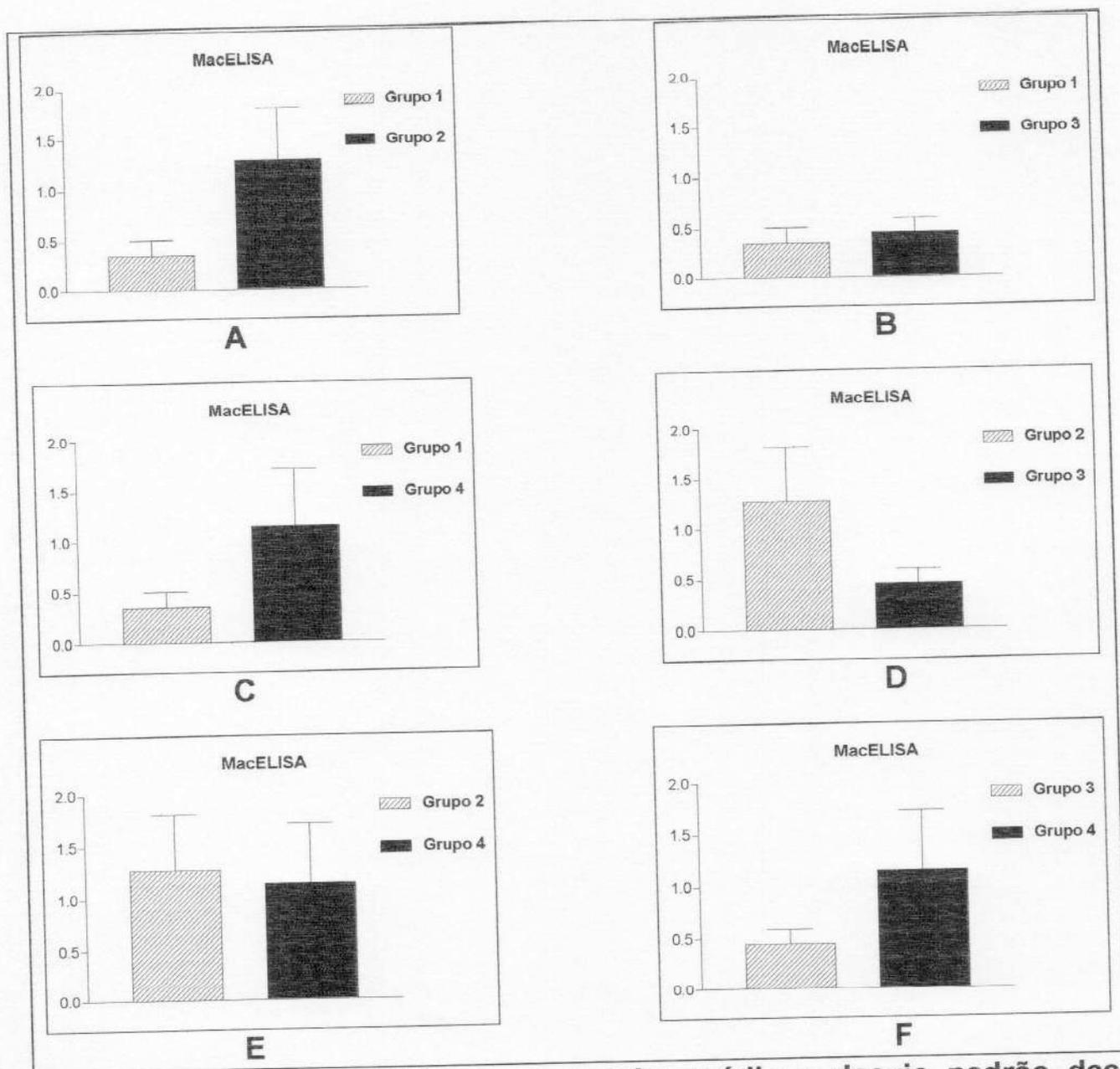


Figura 16: Gráficos obtidos com o valor médio e desvio padrão das absorbâncias através do MacELisa. Sorotipo DEN-2; dos Grupos 1, 2, 3 e 4; entre estes.

Em relação à reatividade ao sorotipo DEN-2 (Tabela 13, Figura 16), este mesmo teste evidenciou que somente as comparações entre os grupos 1 e 3, 3 e 4, não foram significativas ($P > 0,05$) (Gráficos B e F, respectivamente). As demais comparações intergrupos revelaram resultados significativos (P variando entre 0,00004 e 0,001).

4.3.5. Anticorpo IgG comparado entre os grupos

A análise do anticorpo IgG foi comparada cruzando os valores médios e desvio padrão entre os 4 grupos. Obtendo assim, os seguintes resultados:

Tabela 14: Valores médios e desvios padrão das absorbâncias nas comparações entre-grupos em relação ao anticorpo IgG.

ANTICORPO IgG		
	Grupo 1	Grupo 2
Média	0,2335	1,123
Desvio padrão	0,089	0,43
P = 0,00005		
	Grupo 1	Grupo 3
Média	0,2335	0,792
Desvio padrão	0,089	0,3
P = 0,00003		
	Grupo 1	Grupo 4
Média	0,2335	0,6868
Desvio padrão	0,089	0,329
P = 0,0005		
	Grupo 2	Grupo 3
Média	1,123	0,792
Desvio padrão	0,43	0,3
P = 0,07		
	Grupo 2	Grupo 4
Média	1,123	0,6868
Desvio padrão	0,43	0,329
P = 0,02		
	Grupo 3	Grupo 4
Média	0,792	0,6868
Desvio padrão	0,3	0,329
P = 0,47		

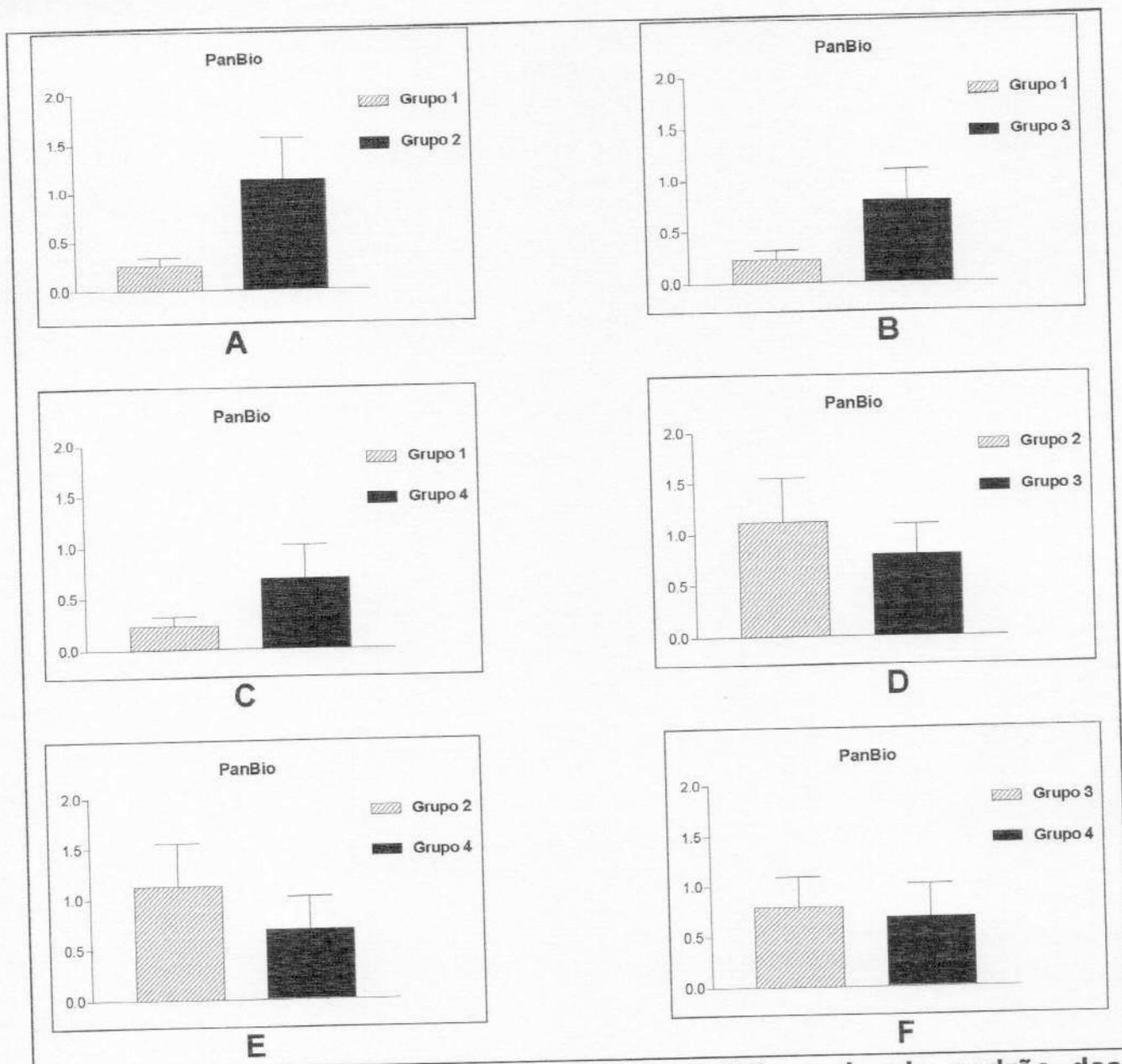


Figura 17: Gráficos obtidos com o valor médio e desvio padrão das absorbâncias através do teste PANBIO, anticorpo IgG dos Grupos 1, 2, 3 e 4; entre estes.

Com relação à reatividade ao anticorpo IgG, o mesmo teste apresentou que somente as comparações intergrupos 1 e 2, 1 e 3, 1 e 4, 2 e 4, tiveram diferenças estatísticas significativas (Gráficos A, B, C e E; respectivamente). Não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos 2 e 3, e, 3 e 4 (Gráficos D e F; respectivamente).

4.3.6. Anticorpo IgM comparado entre os grupos

A análise do anticorpo IgM foi comparada cruzando os valores médios e desvio padrão entre os 4 grupos. Obtendo assim, os seguintes resultados:

Tabela 15: Valores médios e desvios padrão das absorvâncias nas comparações entre-grupos em relação ao anticorpo IgM.

IgM		
	Grupo 1	Grupo 2
Média	0,254	0,658
Desvio padrão	0,167	0,289
P = 0,001		
	Grupo 1	Grupo 3
Média	0,254	0,677
Desvio padrão	0,167	0,295
P = 0,001		
	Grupo 1	Grupo 4
Média	0,254	0,465
Desvio padrão	0,167	0,165
P = 0,01		
	Grupo 2	Grupo 3
Média	0,658	0,677
Desvio padrão	0,289	0,295
P = 0,89		
	Grupo 2	Grupo 4
Média	0,658	0,465
Desvio padrão	0,289	0,165
P = 0,08		
	Grupo 3	Grupo 4
Média	0,677	0,465
Desvio padrão	0,295	0,165
P = 0,06		

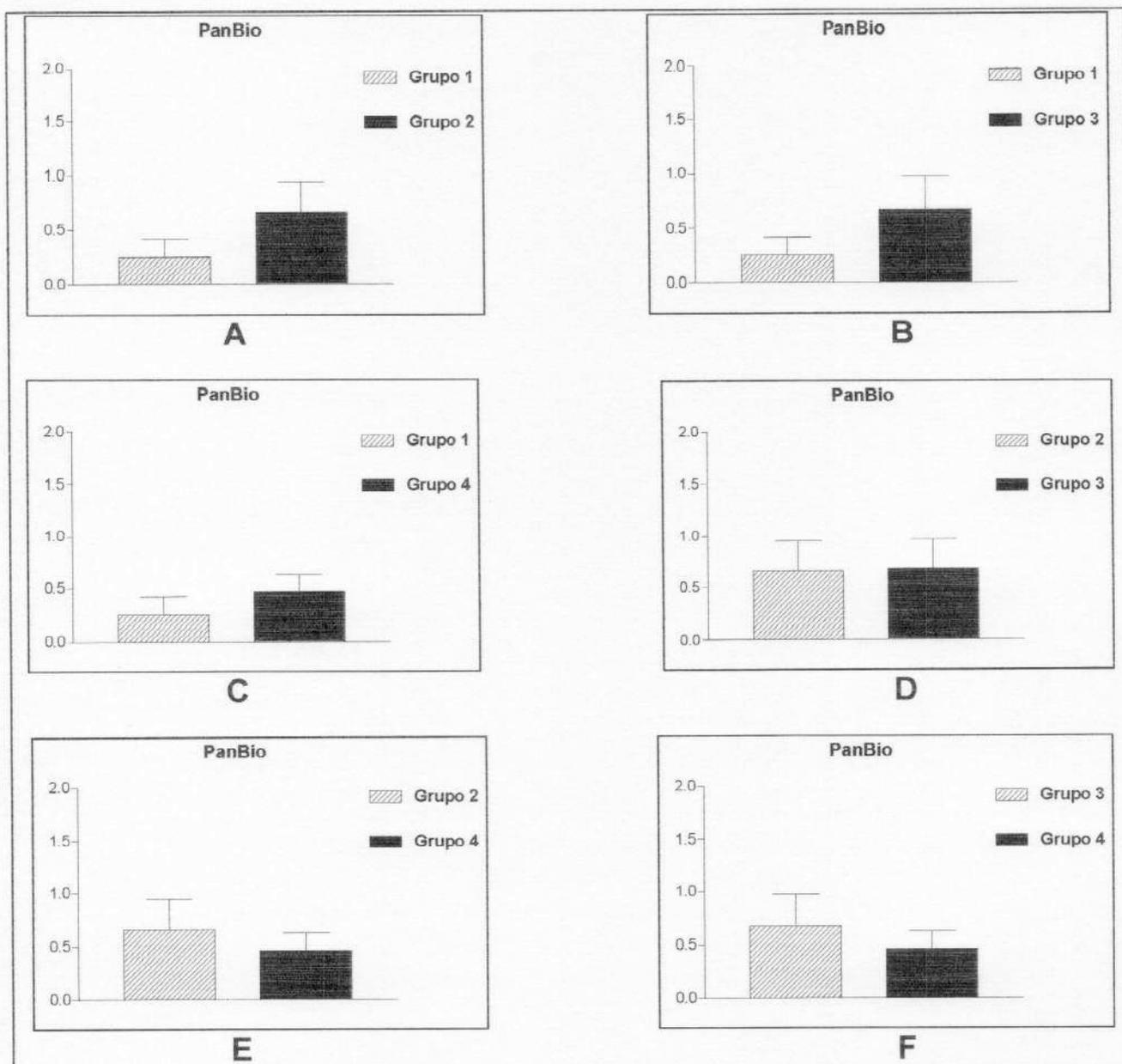


Figura 18: Gráficos obtidos com o valor médio e desvio padrão das absorbâncias através do teste PANBIO, anticorpo IgM dos Grupos 1, 2, 3 e 4; entre estes.

Na comparação do anticorpo IgM intergrupos observou-se que houveram diferenças estatísticas significativas entre as comparações dos grupos 1 e 2, 1 e 3, 1 e 4 (com P variando entre 0,001 e 0,01) (Gráficos A, B e C; respectivamente). Em relação a comparação dos grupos 2 e 3, 2 e 4, 3 e 4 não houveram diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) (Gráficos D, E e F; respectivamente).

4.3.7 Anticorpo IgM entre sorotipos DEN-1 e DEN-2 de cada grupo

Na análise entre-testes foi feita a análise cruzando o valor médio das absorvâncias e seus desvios padrão dos anticorpos IgM e IgG, obtidos através do teste Dengue Duo-PanBio, com os mesmos valores do teste MacELISA correspondentes a cada grupo.

Obtendo assim, os seguintes resultados:

Tabela 16: Valores médios e desvios padrão das absorvâncias do anticorpo IgM e sorotipos DEN-1 e DEN-2, dos grupos 1, 2, 3 e 4. E o valor de P bi-caudal obtido com estes.

GRUPO 1		
	IgM	DEN-1
Média	0,2544	0,3212
Desvio padrão	0,167	0,043
P = 0,237		
GRUPO 1		
	IgM	DEN-2
Média	0,2544	0,3501
Desvio padrão	0,167	0,154
P = 0,2		
GRUPO 2		
	IgM	DEN-1
Média	0,6586	0,936
Desvio padrão	0,289	0,5
P = 0,149		
GRUPO 2		
	IgM	DEN-2
Média	0,6586	1,278
Desvio padrão	0,289	0,532
P = 0,004		

Continua...

Tabela 16 (CONTINUAÇÃO): Valores médios e desvios padrão das absorbâncias do anticorpo IgM e sorotipos DEN-1 e DEN-2, dos grupos 1, 2, 3 e 4. E o valor de P bi-caudal obtido com estes.

GRUPO 3		
	IgM	DEN-1
Média	0,677	1,093
Desvio padrão	0,295	0,564
P = 0,06		
GRUPO 3		
	IgM	DEN-2
Média	0,677	0,446
Desvio padrão	0,295	0,142
P = 0,04		
GRUPO 4		
	IgM	DEN-1
Média	0,465	0,4316
Desvio padrão	0,165	0,102
P = 0,592		
GRUPO 4		
	IgM	DEN-2
Média	0,465	1,143
Desvio padrão	0,165	0,568
P = 0,001		

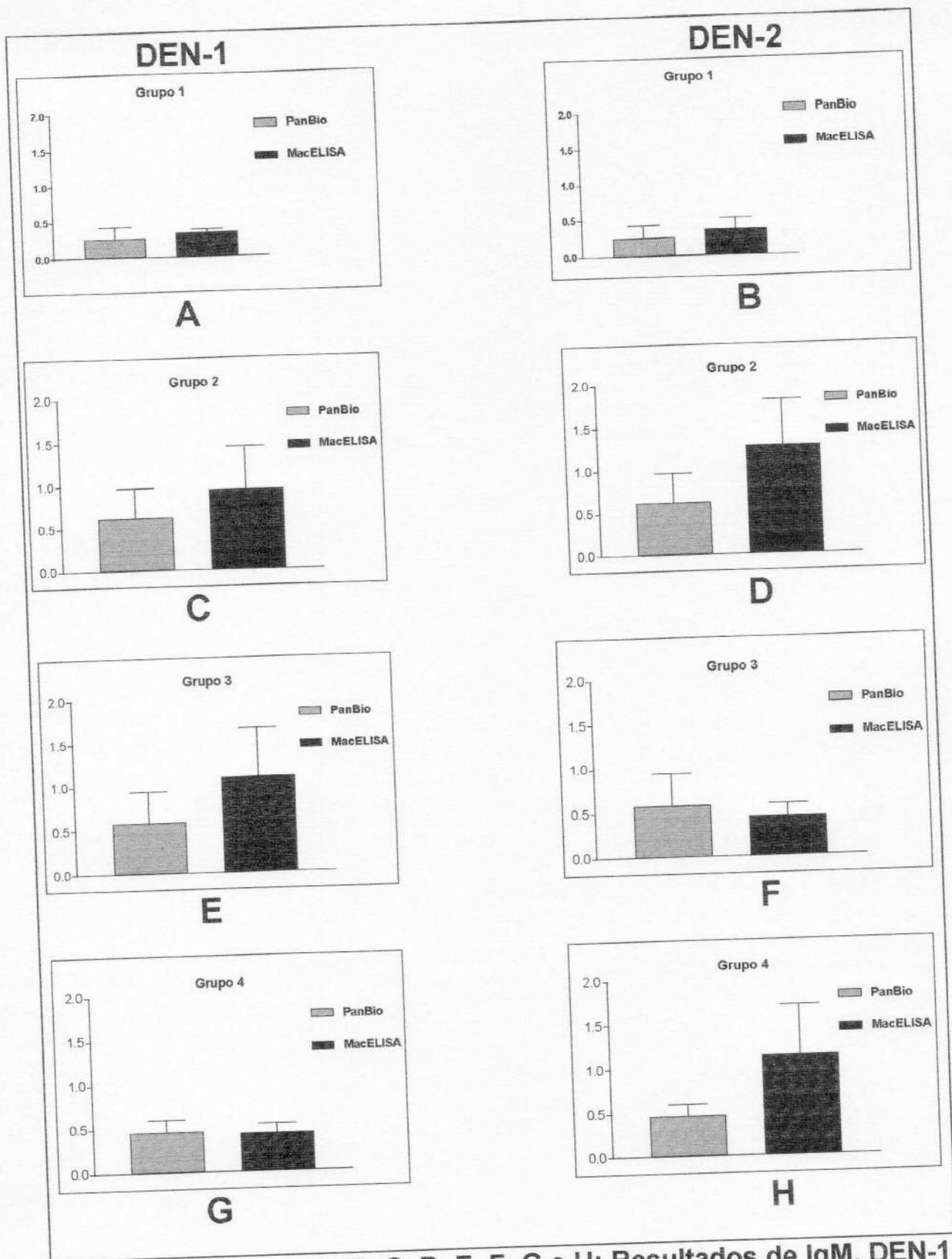


Figura 19: Gráficos A, B, C, D, E, F, G e H: Resultados de IgM, DEN-1 e DEN-2 para os 4 grupos pelos testes MacELISA e PANBIO (valor médio e desvio padrão das absorvâncias).

Na comparação dos teste Mac Elisa e Dengue Duo-PanBio, em relação ao anticorpo IgM, observamos que os sorotipos DEN-1 dos Grupos de 1 a 4; não houveram diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) (Gráficos A, C, E e G; respectivamente). Já este mesmo anticorpo em relação ao sorotipo DEN-2 somente foi encontrado diferenças nos grupos 2, 3 e 4 (P variando entre 0,001 e 0,04) (Gráficos D, F e H). Tendo havido encontrado diferenças no Grupo 1 ($P > 0,05$).

4.4. Western Blotting

O teste “Western Blotting” mostrou somente perfis característicos de marcadores moleculares nas amostras do Grupo 2. Tendo sido encontrado o número total de frações antigênicas, 58, estas foram agrupadas em faixas, e extraído a frequência de cada faixa. Encontrando-se os seguintes resultados:

- *Grupo 2, sorotipo DEN-1, Anticorpo IgG*: Total de frações encontradas, 6. Proteínas com peso molecular de 41-50 kDa, 1 (16,6%); P.M. 51-60 kDa, 3 (50%); P.M. 71-80 kDa, 1 (16,6%); P.M. 81-90 kDa, 1 (16,6%).

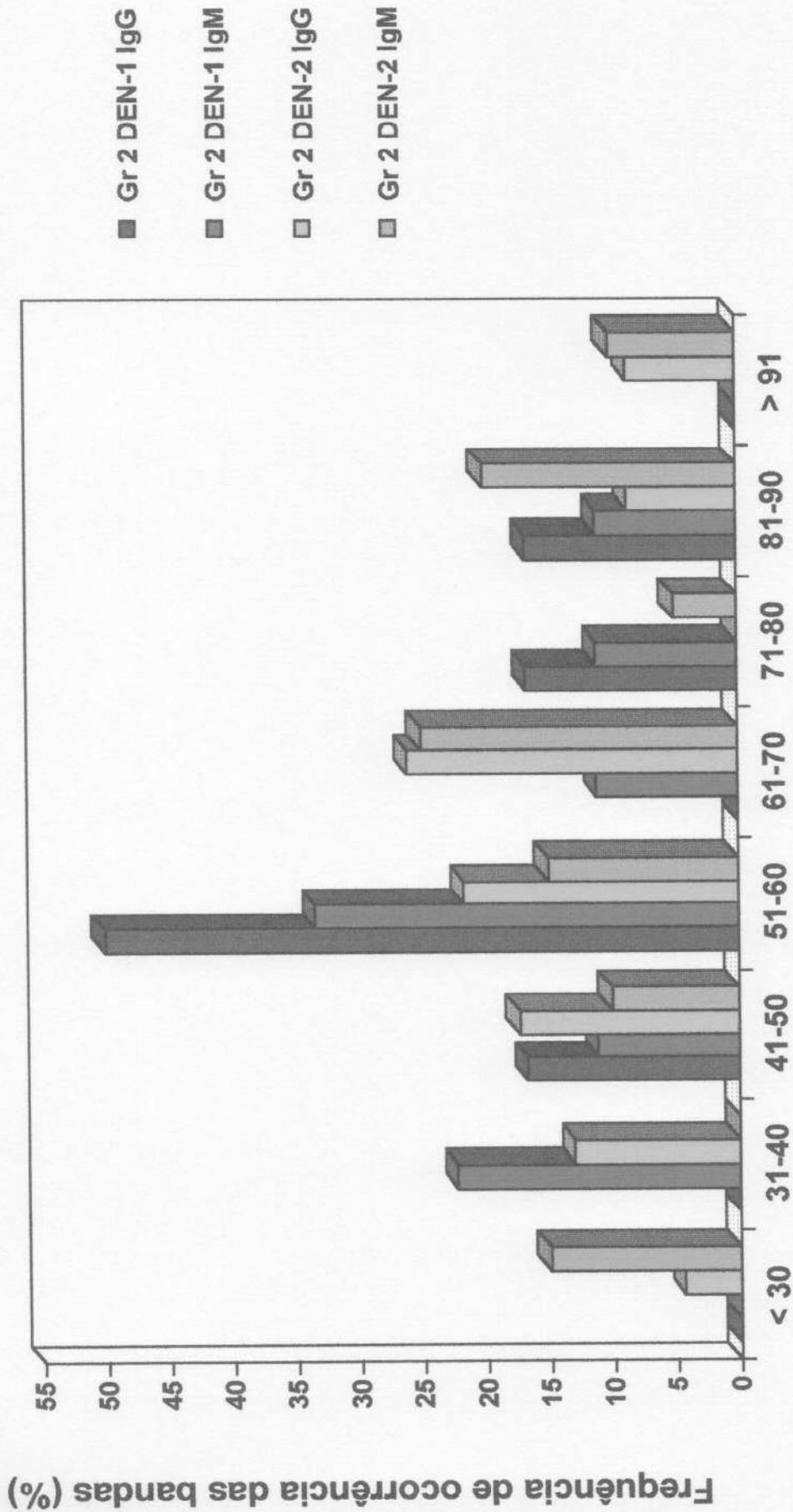
- *Grupo 2, sorotipo DEN-1, Anticorpo IgM*: Total de frações encontradas, 9. Proteínas com peso molecular de 31-40 kDa, 2 (22,2%); 41-50 kDa, 1 (11,1%); P.M. 51-60 kDa, 3 (33,3%); P.M. 61-70 kDa, 1 (11,1%); P.M. 71-80 kDa, 1 (11,1%); P.M. 81-90 kDa, 1 (11,1%).

- *Grupo 2, sorotipo DEN-2, Anticorpo IgG*: Total de frações encontradas, 23. Proteínas com peso molecular <30 kDa, 1 (4,3%), P.M. 31-40 kDa, 3 (13%); P.M. 41-50 kDa, 4 (17,3%); P.M. 51-60 kDa, 5 (21,7%); P.M. 61-70 kDa, 6 (26%); P.M. 81-90 kDa, 2 (8,6%); P.M. >91 kDa, 2 (8,6%).

- *Grupo 2, sorotipo DEN-2, Anticorpo IgM*: Total de frações encontradas, 20. Proteínas com peso molecular <30 kDa, 3 (15%); P.M. 41-50 kDa, 2 (10%); P.M. 51-60 kDa, 3 (15%); P.M. 61-70 kDa, 5 (25%); P.M. 71-80 kDa, 1 (5%); P.M. 81-90 kDa, 4 (20%), P.M. >90 kDa, 2 (10%).

Tabela 17. Distribuição de faixas dos pesos moleculares detectados e frequência dos sorotipos Den-1 e Den-2 para o grupo 2, de acordo com cada conjugado utilizado.

		Faixas de pesos moleculares (kDa)								
Sorotipo/ Conjugado	< 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90	> 91	Total	
Den-1/IgG	—	—	1 (16,6%)	3 (50%)	—	1 (16,6%)	1 (16,6%)	—	6 (10,3%)	
Den-1/IgM	—	2 (22,2%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	—	9 (15,5%)	
Den-2/IgG	1 (4,3%)	3 (13%)	4 (17,3%)	5 (21,7%)	6 (26%)	—	2 (8,6%)	2 (8,6%)	23 (39,6%)	
Den-2/IgM	3 (15%)	—	2 (10%)	3 (15%)	5 (25%)	1 (5%)	4 (20%)	2 (10%)	20 (34,4%)	
Total	4 (6,8%)	5 (8,6%)	8 (13,7%)	14 (24,1%)	12 (20,6%)	3 (5,1%)	8 (13,7%)	4 (6,8%)	58	



PM aparente (kDa)

Figura 20: Distribuição de faixas dos pesos moleculares detectados e frequência dos sorotipos DEN-1 e DEN-2, do grupo 2, de acordo com cada conjugado utilizado.

5-DISCUSSÃO

A validade da comparação entre os testes de captura de anticorpos, MacELISA e Dengue Duo-PanBio, esta somente na captura da IgM. Visto que este segundo captura tanto IgG quanto IgM, enquanto o MacELISA detecta apenas o anticorpo IgM.

Em infecções recentes e algumas secundárias, a detecção de níveis de anticorpos pelo Dengue Duo-PanBio pode ser baixa. Pacientes infectados não mais apresentam níveis de anticorpos detectáveis do 7º ao 10º dia; sendo que a coleta deve ser realizada antes deste período.

Alguns testes sorológicos do grupo Flavivirus podem apresentar reatividade cruzada entre vírus dengue com os vírus causadores da encefalite japonesa e febre amarela. Sendo que INNIS (1999) e MAKINO (1994) ao usarem o Dengue Duo-Panbio não encontraram tal reatividade cruzada.

O teste Dengue Duo-PanBio é um "kit" que favorece um diagnóstico em menos de 4 horas. Seu princípio é o mesmo do MacELISA. Sendo que em ambas as amostras clínicas de sangue não devem apresentar lipemia.

De acordo com a bibliografia consultada, já existem pelo menos 2 "kit's" de testes rápidos para diagnóstico da Dengue. Sendo de fácil

utilização e terem feito surgir um novo objeto de pesquisa para pesquisadores (KUNO et al, 1998).

INNIS et al (1989) e mais recentemente, RUECHUSATAK et al (1994), sugeriram haver diferenças nos níveis do anticorpo IgG entre uma infecção primária e secundária. Sendo a última caracterizada por altos níveis do anticorpo IgG (>70%). E é esta informação que possibilita diferenciar infecção primária e secundária.

O teste “*Western Blotting*” demonstrou ser um meio eficiente para determinar o perfil protéico dos sorotipos DEN-1 e DEN-2. No entanto demonstrou inespecificidade em relação a algumas amostras. Somente no grupo 2, é que foi possível visualizar as bandas com mais clareza. Enquanto que nos demais, após a revelação as fitas, as bandas não se apresentaram com nitidez, e sendo excluídos deste estudo.

É importante salientar que durante todas os testes de “*Western Blotting*”, bem como as eletroforese em gel poliacrilamida, os protocolos e os materiais foram os mesmos. Além de ter sido mantido as mesmas concentrações na diluição dos soros e conjugados.

De acordo com HEINZ (1986) e SMITH & WRIGHT (1985), a proteína estrutural E é a maior encontrada nos vírus da dengue. Desempenhando ainda importante funções biológicas. Sendo esta a maior (PM 53 a 58 kDa), e mais importante, o cálculo de RF nos mostra que nos 4

testes selecionados as bandas protéicas que apareceram com mais frequência foram as que se encontravam na faixa de 51 a 60 kDa. Confirmando assim a citação bibliográfica.

No entanto a única exceção encontrada foi teste em que se usou o sorotipo DEN-2 e anticorpo IgM, onde as bandas protéicas que tiveram maior frequência foram as de P.M. aparente entre 61 e 70 kDa.

Não foram encontradas proteínas consideradas de P.M. baixo (12 a 14 kDa). O que corresponderia a proteína C, que é associada com o RNA viral e forma o nucleocapsídeo. (RICE & COLS, 1986; MARKOFF, 1989)

As proteínas ditas não estruturais de PM 35 a 53 kDa, ou simplesmente NS₁ (MACKOW & COLS, 1987), foram detectadas nos 4 testes selecionados.

A segunda maior proteína, a NS3, também não estrutural (P.M. 68 a 70 kDa) (MANDL et al, 1989), foi a segunda maior frequência em 3 dos 4 testes. A exceção, novamente foi no sub-grupo sorotipo DEN-2 anticorpo IgM, onde esta apresenta a maior frequência (25%) em relação às demais.

Não foi detectada a proteína NS5 de P.M. 103 a 104 kDa. Embora ela seja considerada a mais conservada proteína dos Flavivírus (BARBOSA, 1996).

6- CONCLUSÕES

O teste MacELISA demonstrou maior sensibilidade que o Dengue Duo-Panbio na detecção de anticorpos da classe IgM contra dengue por infecção pelo sorotipo DEN-2, para as amostras dos grupos 2 e 4, durante a fase aguda da infecção.

Para Dengue por infecção pelo sorotipo DEN-1 observou-se predomínio de epítopos imunodominantes na faixa de 51 a 60kDa pela teste "Western-Blotting".

As frações com pesos moleculares abaixo de 30 kDa só foram detectadas para DEN-2 pelo "Imunoblotting".

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, M. L. Dengue: Revisão. *Ver. Inst. Adolfo Lutz*. 56(1): 27-45, 1996.

BHAMARAPRAVATI, N. Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Journal Infect. Dis.*, 2 (Suppl. 4): S826-S829, 1989.

CHUNDBOONCHART, V., BHAMARAPRAVATI, N., PEAMPREMPRECH, A. C., SIRIVANINI, S. & CHAIYOTA, A. Antibodies to dengue viral polypeptides. I. Sensitivity and sperecificity of the viral-antigen-strips/enzyme immunoassay. *South. Asian J. Trop. Med. Public Health*, 18: 362-372, 1988.

DeMADRID, A. T. & PORTERFIELD, J. S. The flavivirus (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.*, 67: 209-213, 1986.

DENGUE DUO IgM and IgG Capture Elisa Test. Brisbane, Austrália: PanBio, 1988. 3p. Manual.

DEUBEL, V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. *CAB International. London*. 335-366. 1997.

- ECKELS, K. H., KLIKS, S. G., DUBOIS, D. R., WAHL, L. M. & BANCROFT, W. H.** The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue-2 live-virus vaccine. *J. immunol.*, 135: 4201-4203, 1985.
- FEIGHNY, R., BURROIS, J. & PUTNAK, R.** Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protect mice against virus challenge. *J. Trop. Med. Hyg.*, 50: 322-328, 1994.
- GUBLER, D. J.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiologic Reviews.*, 11(3): 480-496, 1998.
- GUBLER, D. J. & CASTA-VELEZ, A.** A program for prevention and control of epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico and the U. S. Virgin Islands. *Bull. Pan Am. Health Org.*, 25: 237-247, 1991
- GUZMAN, M. G. & KOURI, G.** Advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3: 621-627, 1996.
- HALSTEAD, S. B.** The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *Raap. Trimest. Stat. Sanit. Mond.*, 45: 292-298, 1992.

- HALSTEAD, S. B. MARCHETTE, N. J., DIWAN A. R.** Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. III. Athributis. Reversion to virulence by pasage of cloned virus in fetal Rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Hyg.*, 33: 672-678, 1984.
- HALSTEAD, S. B.** Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239: 476-481, 1988.
- HALSTED, S. B.** Observations related to pathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. VI Hypotesis and discussion. *Yale J. Biol. Med.* 42: 350-362, 1970.
- HEINZ, E. X.** Epitope mapping of flavivirusglycoproteins. *Adv. Virus Res.*, 31(3): 103-168, 1986.
- INNIS, B. L.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. In *J. S. Porterfield (ed.)*, Exotic viral infections. Chapman & Hall, London, United Kingdom. 103-146, 1995.
- KOURI, G., GUZMÁN, M. G., BRAVO, J.** Why Dengue hemorrhagic fever in Canada? II An integral analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 821-823, 1987.
- KUNO, G. CROPP, C. B., WONG-LEE, J. GUBLER, D. J.** Evaluation of na IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(5):757-762, 1998.

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

LANCIOTTI, R. S., LEWIS, J. L., GUBLER, D. J., CHANG, G. J. & VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from samples using reverse transcriptase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 545-551, 1992.

MANDL, C. W., HEINZ, F. X., STÖCKL, E. & KUNZ, C. Genome sequence of Tick-Borne Encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other Flaviviruses. *Virology*. 173: 291-301, 1989.

MARKOFF, L. In vitro processing of dengue structural proteins: cleavage of the premembrane protein. *J. Virol.* 63: 3345-3352, 1989.

MONATH, T. P. Dengue, the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 91-98, 1994.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *Guidelines for preventions and control*. Washington, D.C.: PAHO, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle. Genebra, 1987.

A N E X O

- PINHEIRO, F. P. & CORBER, S. J.** Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.*, 50: 161-169, 1997
- PRYOR, M. J. & WRIGHT, P. J.** Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.*, 75: 1183-1187, 1994.
- RACE, M., WILLIAMS, M. C. & AGOSTINI, C. E.** Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73: 18-22, 1979.
- ROSEN, L.** The emperor's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26(3): 337-343, 1977.
- ROSEN, L.** Viral diseases in Southeast Asia and the Western Pacific. In *J. S. Mackenzie (ed.)*, Academic Press Ltd. Sydney, Australia, 484-493, 1982.
- SABIN, A. B.** Research on dengue during World War II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1: 30-50, 1952.
- SIER, J. F., HALL, M. W., HITCHENS, A. P.** Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philipp. J. Sci.*, 29: 1-304, 1926.

SMITH, G. W. & WHIGHT, P. J. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. *J. Gen Virol.* 66: 559-571, 1985.

SOUZA, R. V. de, ALMEIDA, M. C. de M., MOREIRA, T. M. S., *Dengue*. Belo Horizonte: Fundação Nacional de Saúde - CRMG, 1995. 19p. Informe Técnico, 18.

TESH, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses using mosquito cells cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 1053-1059, 1979.

TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354, 1994.

WESTWAY, E. G., BRITON, M. A., GAIDAMOVICH, S., HORZINEK, M. C. Flaviridae. *Intervirology*, 24: 183-192, 1985.

WINKLER, G., RANDOLPH, V. B., CLEAVES, G. R., RYAN, T. E. & STOLLAR, V. Evidence that the nature form of flavivirus nonstructural protein NS₁ is a dimer. *Virology*, 162: 187-196, 1988.

Ficha Individual de Investigação / SINAN

SUS - MS - CENEPI		SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO			DENGUE	
DADOS GERAIS						
1-NÚMERO DA NOTIFICAÇÃO		2-DATA DA NOTIFICAÇÃO / /		3-SEMANA EPIDEMIOLÓGICA DE NOTIFICAÇÃO		
4-CÓDIGO MUNICIPAL		5-NOME MUNICIPAL				
6-CÓDIGO UNIDADE DE SAÚDE		7-NOME UNIDADE DE SAÚDE				
DADOS DO CASO						
8-NOME DO PACIENTE						
9-DATA NASCIMENTO / /			10-IDADE		11-SEXO <input type="checkbox"/> 1-MASCULINO <input type="checkbox"/> 2-FEMININO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO	
12-GRAU DE INSTRUÇÃO		1-ANALFABETO		3-2º GRAU		4-SUPERIOR
13-GRAU DE INSTRUÇÃO		1-ANALFABETO		2-1º GRAU		3-2º GRAU
14-CÓDIGO MUNICIPAL		15-NOME MUNICIPAL		13-DATA PRIMEIROS SINTOMAS		SEMANA DOS PRIMEIROS SINTOMAS
16-CÓDIGO DISTRITO		17-NOME DO DISTRITO				
18-CÓDIGO BAIRRO		21-BAIRRO OU LOCALIDADE			18-ZONA <input type="checkbox"/> 1-URBANA <input type="checkbox"/> 2-RURAL <input type="checkbox"/> 13-UF	
22-ENDEREÇO (RUA, AVENIDA, Nº, APTº)						
23-PONTO DE REFERÊNCIA						
DADOS COMPLEMENTARES DO CASO						
25-EM TRÂNSITO		26-DURANTE OS ÚLTIMOS 15 DIAS, O PACIENTE DESLOCOU-SE DO LOCAL DE RESIDÊNCIA		24-TELEFONE ()		
1-SIM <input type="checkbox"/> 2-NÃO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO		1-SIM <input type="checkbox"/> 2-NÃO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO		EM CASO AFIRMATIVO, ESPECIFIQUE: est/país _____		
27-NOTOU PRESENÇA DE MOSQUITOS PICANDO DURANTE O DIA		28-ONDE		DATA DO RETORNO: / /		
1-SIM <input type="checkbox"/> 2-NÃO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO		1-1-DOMICÍLIO <input type="checkbox"/> 2-TRABALHO <input type="checkbox"/> 3-DURANTE O DESLOCAMENTO (viagem) <input type="checkbox"/>				
29-LOCAL PROVÁVEL ONDE CONTRAIU A DOENÇA						
30-TEVE DENGUE ANTES						
1-SIM <input type="checkbox"/> 2-NÃO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO		SE SIM, ONDE: localidade: _____		município: _____ estado: _____		
QUANDO: ano: _____						
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS						
31- 1-SIM <input type="checkbox"/> 2-NÃO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO						
<input type="checkbox"/> FEBRE		<input type="checkbox"/> CEFALÉIA		<input type="checkbox"/> DOR RETRO-ORBITÁRIA		<input type="checkbox"/> MIALGIA
<input type="checkbox"/> EXANTEMA		<input type="checkbox"/> DOR ABDOMINAL		<input type="checkbox"/> PETEQUIAS		<input type="checkbox"/> EPITAXE
<input type="checkbox"/> HEMORRAGIAS DIVERSAS		<input type="checkbox"/> CHUVE: EXT. FRIAS / SUORES		<input type="checkbox"/> NÁUSEAS / VÔMITOS		<input type="checkbox"/> ASCITE
				<input type="checkbox"/> PROSTRACÃO		<input type="checkbox"/> ARTRALGIA
				<input type="checkbox"/> GENGIVORRACIA		<input type="checkbox"/> HEPATOMEGALIA
				<input type="checkbox"/> DERRAME PLEURAL		
PULSO _____ bpm		T. ARTERIAL _____ mmHg		DATA: / /		
		T. ARTERIAL _____ mmHg		DATA: / /		
DADOS LABORATORIAIS						
32-PROVA DO LAÇO		33-HEMATOCRITO _____ %		DATA _____		
1-POSITIVA <input type="checkbox"/> 2-NEGATIVA <input type="checkbox"/> 3-NÃO REALIZADA <input type="checkbox"/>		HEMATOCRITO _____ %		PLAQUETAS _____ mm ³ DATA _____		
34-ISOLAMENTO DO VÍRUS		35-SOROTIPO		PLAQUETAS _____ mm ³ DATA _____		
1-POSITIVO <input type="checkbox"/> 2-NEGATIVO <input type="checkbox"/> 3-NÃO REALIZADO <input type="checkbox"/>		1-SOROTIPO I <input type="checkbox"/> 2-SOROTIPO II <input type="checkbox"/> 3-SOROTIPO III <input type="checkbox"/> 4-SOROTIPO IV <input type="checkbox"/>				
36-MAC ELISA		37-INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (IH)				
AMOSTRA DATA DA COLETA RESULTADO		AMOSTRA DATA DA COLETA RESULTADO				
1º _____		1º _____				
2º _____		2º _____				
DIAGNÓSTICO						
38-DIAGNÓSTICO		39-CRITÉRIO DIAGNÓSTICO		40-DATA		41-EVOLUÇÃO
1-DENGUE CLÁSSICO <input type="checkbox"/> 2-FEBRE HEMORRÁGICA DO DENGUE <input type="checkbox"/> 3-DESCARTADO (especificar) _____		1-CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO <input type="checkbox"/> 2-LABORATORIAL <input type="checkbox"/>		_____		1-CURA <input type="checkbox"/> 2-ÓBITO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO <input type="checkbox"/>
INFORMAÇÃO DO VETOR						
42-CASO		43-PRESENÇA DE MOSQUITOS DO GÊNERO AEDES		44-FOI VACINADO CONTRA FEBRE AMARELA		
1-IMPORTADO <input type="checkbox"/> 2-AUTOCTONE <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO <input type="checkbox"/>		AEGYPTI: <input type="checkbox"/> 1-POSITIVO <input type="checkbox"/> 2-NEGATIVO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO <input type="checkbox"/>		1-SIM <input type="checkbox"/> 2-NÃO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO <input type="checkbox"/>		
		ALBOPICTUS: <input type="checkbox"/> 1-POSITIVO <input type="checkbox"/> 2-NEGATIVO <input type="checkbox"/> 9-IGNORADO <input type="checkbox"/>				
INVESTIGAÇÃO						
45-NOME DO MUNICÍPIO/UNIDADE DE SAÚDE		48-FUNÇÃO		49-DATA		50-ASSINATURA
47-NOME						

