

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

APLICADAS

SISBI/UFU



1000214393

MON
616.92
C3312
TES/ME4

**Detecção dos Isotipos IgM, IgA e IgG na Infecção pelo
Vírus do Dengue e sua Reatividade aos Sorotipos Virais
DEN-1, DEN-2 e DEN-3**

Cíntia Barbosa de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
parte de obtenção do título de Mestre

Uberlândia

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Cíntia Barbosa de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
parte de obtenção do título de Mestre

Uberlândia

2004

Dedico a minha família: aos meus queridos pais e irmã que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e fizeram de mim o que hoje sou: UMA VITORIOSA!

Obrigada por existirem.

Pensamento

“ Jamais desanime! Embora sua dor pareça insuportável e sem remédio, ela há de terminar e a alegria voltará a brilhar em seu coração. Não há noite eterna a qual não suceda a luz de um dia radiante.

Dos sofrimentos passados conservamos apenas uma lembrança quase apagada. Assim acontecerá amanhã com os sofrimentos de hoje. Entregue tudo ao tempo que, com sua mão compassiva, balsamizará todas as suas dores.”

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Mineo; pela orientação, pelo oferecimento de condições ótimas para realizar esta pesquisa e por acreditar que eu conseguiria desenvolver um trabalho brilhante. Obrigada por me ajudar a conquistar este título.

Agradeço à Doutoranda Deise Aparecida de Oliveira Silva por sempre me estender a mão em todos os momentos que lhe precisei, como um orientador.

Agradeço à Bióloga Elisabeth de Oliveira Miranda (Betinha), que me passou todos os seus conhecimentos sobre a técnica empregada neste trabalho.

Agradeço à Doutoranda Mônica Camargo Sopelete que me auxiliou muitas vezes, via telefone, nos programas gráficos.

Agradeço à Engenheira Agrônoma e funcionária da Prefeitura de Uberlândia, Cristina Ferreira do Carmo, pela companhia e ajuda nos longos momentos de bancada.

Agradeço à Bióloga e também funcionária da Prefeitura de Uberlândia, Ana Cláudia de Lima, por estar sempre ao meu lado.

Agradeço aos colegas que sempre me direcionaram palavras animadoras: Fernanda Santiago, Gaby, Fernanda Caroline e Fernando Lourenço.

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
1-Introdução	2
1.1- Epidemiologia	2
1.2- Distribuição geográfica	4
1.3- Etiologia	5
1.4- Ciclo de transmissão do vírus do dengue	6
1.5- Proteínas do vírus do dengue	9
1.6- Aspectos clínicos	11
1.7- Patogênese da DHF	13
1.8- Fatores de risco para DHF	18
1.9- Diagnóstico laboratorial	21
1.10- Tratamento	23
1.11-Justificativa	25
2- Objetivos	29
2.1- Objetivo geral	29
2.2- Objetivos específicos	29
3- Material e Métodos	31
3.1- População de estudo e amostras de soro	31
3.2- Antígenos do vírus do dengue	31
3.3- ELISA de captura para detecção dos anticorpos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue	32

3.4- Reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue	34
3.5- Análise Estatística	35
4- Resultados	37
4.1- Positividade para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue	37
4.2- Níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue	42
4.3 Correlação entre os níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue	44
4.4- Reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue	48
4.5- Distribuição das amostras de soro reativas para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue	50
5- Discussão	53
6- Conclusões	61
7- Apêndice	63
8- Referências Bibliográficas	66

RESUMO

Dengue é atualmente a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui sério problema de saúde pública no mundo, principalmente nos países tropicais. O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de anticorpos dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, por reações imunoenzimáticas de captura (MAC-, AAC- e GAC-ELISA, respectivamente) e analisar a reatividade destes anticorpos aos sorotipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3). Um total de 504 amostras de soros de pacientes com sintomas sugestivos de infecção pelo vírus do dengue foi escolhido aleatoriamente entre as amostras colhidas nos anos de 1997, 2000 e 2003, e enviadas ao Laboratório de Imunologia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil. As porcentagens de positividade para todos os isotipos estudados aumentaram significativamente de 1997 a 2003. Níveis de IgM e IgG foram maiores do que os de IgA em 1997 e 2003, enquanto que os níveis dos três isotipos não foram significativamente diferentes em 2000, período em que os menores níveis de IgM e IgG foram encontrados. No geral, os níveis de anticorpos detectados por MAC-, AAC- e GAC-ELISA mostraram uma forte correlação positiva durante todo o período estudado, mas quando foram analisadas somente as amostras reativas, uma correlação positiva significante foi encontrada somente para os isotipos IgG e IgA. De acordo com o grau de reatividade ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue, diferenças significativas foram observadas durante os anos estudados. O epítopo E4 presente no sorotipo DEN-2 foi predominantemente reconhecido por todos isotipos em 1997, enquanto que este epítopo presente em DEN-2 e DEN-3 foi mais reconhecido pelos isotipos de anticorpos em 2000. No entanto, em 2003, uma alteração significativa foi

observada no padrão de reatividade para o epítopo E4 presente nos sorotipos virais, uma vez que este epítopo presente em DEN-3 foi mais reconhecido por todos os isotipos estudados. Conclui-se, portanto, que a determinação dos níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue e de suas reatividades ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos virais podem fornecer informações úteis sobre os estágios da infecção, contribuindo para o estabelecimento de uma conduta clínica mais adequada e diminuindo, dessa maneira, a probabilidade de doença fatal.

Palavras-chave: Vírus do dengue, sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3, isotipos IgM, IgA e IgG.

SUMMARY

Dengue is currently the most important arbovirus disease that affects humans and it constitutes a serious problem of public health in the world, mainly in the tropical countries. The aim of this study was to determine dengue-specific IgM, IgA, and IgG levels by capture immunoenzymatic assays (MAC-, AAC-, and GAC-ELISA, respectively) and to analyze their reactivity to dengue serotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3). A total of 504 serum samples from patients with symptoms suggestive of dengue virus infection were randomly chosen among samples collected and sent to the Immunology Laboratory in 1997, 2000, and 2003, in Uberlândia, MG, Brazil. Positivity rates for all isotypes increased significantly from 1997 to 2003. IgM and IgG levels were higher than IgA in 1997 and 2003, whereas isotype levels were not significantly different in 2000, when lower levels of IgM and IgG were found. Overall, the antibody levels detected by MAC-, AAC-, and GAC-ELISA showed a strong positive correlation in the studied years, but when analyzing only the reactive samples, a significant positive correlation was solely found for IgG and IgA. Concerning the degree of reactivity for dengue serotypes, noteworthy differences were observed during the time of this study. DEN-2 was the major serotype for all isotypes in 1997, while both DEN-2 and DEN-3 were the predominant serotypes for all isotypes in 2000. However, in 2003, a significant modification was observed in the pattern of reactivity to viral serotypes, when DEN-3 became the predominant one for all studied isotypes. Altogether, it can be concluded that the measurement of dengue-specific isotype levels and their differential reactivity to viral serotypes can supply useful information about the different stages of infection, contributing to the establishment of appropriate treatment and decreasing the probability of fatal disease.

Keywords: Dengue virus, DEN-1, DEN-2, DEN-3 serotypes, IgM, IgA, IgG isotypes.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia

As infecções por arbovírus têm adquirido grande importância na saúde pública internacional nas últimas décadas, principalmente devido a sua distribuição mundial e as consideráveis taxas de morbidade e mortalidade na população humana (KORAKA et al., 2002).

Dengue é atualmente a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui sério problema de saúde pública no mundo, principalmente na maioria dos países tropicais (BRASIL, 1996; ROCCO et al., 2001). O principal transmissor do dengue é o mosquito *Aedes aegypti*, mas existe a possibilidade da doença também poder ser transmitida por *Aedes albopictus* (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Aedes aegypti é, essencialmente, um mosquito urbano e doméstico, com hábitos diurnos. Sua presença em áreas rurais é atribuída ao transporte de recipientes com larvas e ovos e sua ação noturna geralmente ocorre quando existe luz artificial (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ, 2002).

De acordo com Da Silva et al. (2001), *Aedes albopictus* é apontado como vetor emergente que tem apreciável poder invasivo e compete com *Aedes aegypti* em várias regiões do continente americano. Ambas espécies são ecologicamente homólogas, podendo utilizar os mesmos tipos de criadouros. No entanto, *Aedes albopictus* apresenta maior grau de hábitos silvestres e possui caráter de domiciliação inferior ao apresentado por *Aedes aegypti*.

De acordo com estudos realizados em Vitória, ES, *Aedes albopictus* ainda não pode ser considerado um vetor durante epidemias de dengue no Brasil, uma vez que não foi possível obter isolamento do vírus de fêmeas dessa espécie, apesar da circulação ativa do sorotipo DEN-1 (DEGALLIER et al., 2003).

Dois fatores principais são diretamente responsáveis para a emergência e re-emergência do dengue: aumento na densidade e distribuição geográfica do vetor e a alta capacidade de alcance geográfico da transmissão do vírus (GUZMÁN; KOURI, 2002). O primeiro fator é amplamente influenciado pelas grandes mudanças demográficas globais, particularmente o crescimento populacional global e a urbanização não planejada (BRASIL, 1996; BELO HORIZONTE, 2000), resultando em favelas, fornecimento e sistema de manejo de água inadequados e debilitados (GIBBONS; VAUGHN, 2002; GUZMÁN; KOURI, 2002). No entanto, devido à globalização, todas as classes sociais acabam sendo responsáveis pelo aumento na densidade do vetor (FIOCRUZ, 2002; TEIXEIRA et al., 2003).

A alta capacidade de alcance geográfico da transmissão do vírus acaba sendo influenciada pela maior disponibilidade, frequência e rapidez dos meios de transporte (GUZMÁN; KOURI, 2002), possibilitando uma alternância dos sorotipos do vírus do dengue de uma região para outra (CAMPBELL-LENDRUM; REITHINGER, 2002), tornando praticamente impossível a erradicação a médio prazo do *A. aegypti* (PIMENTA; DA SILVA, 2001). Além disso, as mudanças climáticas (CAMPBELL-LENDRUM; REITHINGER, 2002), a evolução do vírus (GUZMÁN; KOURI, 2002) e a resistência dos ovos de

Aedes aegypti mais de um ano fora d'água, eclodindo quando entram em contato com ela (FIOCRUZ, 2002), também são fatores que influenciam a emergência dessa doença.

A situação epidemiológica é piorada pela deterioração dos sistemas de saúde e pela descontinuidade dos programas de controle ao mosquito em muitas áreas endêmicas da doença (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; GUZMÁN et al., 1999; GUZMÁN; KOURI, 2002).

1.2- Distribuição geográfica

O dengue tem sido relatado nas Américas há mais de 200 anos. Na década de 50, a febre hemorrágica do dengue (FHD) foi descrita, pela primeira vez, nas Filipinas e Tailândia. Após a década de 60, a circulação do vírus do dengue intensificou-se nas Américas (BRASIL, 2001; FIOCRUZ, 2002).

O acontecimento epidemiológico mais relevante na história do dengue nas Américas foi a epidemia de dengue hemorrágico e síndrome do choque do dengue (DHF/DSS) que ocorreu em Cuba, no ano de 1981, quando foram notificados 344.203 casos, com 116.143 hospitalizações (TEIXEIRA et al., 1999).

No Brasil há referências sobre o dengue desde 1846. Mas a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista – Roraima, causada pelos sorotipos DEN-1 e DEN-4 (BELO HORIZONTE, 2000).

Em 1986 ocorreu uma epidemia de grande magnitude no Rio de Janeiro, onde pelo menos 1 milhão de pessoas foram infectadas pelo sorotipo Den 1

(BRASIL, 1996; BRASIL, 2001). Outros estados (Ceará, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Tocantins, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) notificaram surtos no período de 1986/1993 (BRASIL, 2001).

A introdução de sorotipo 2 foi detectada em 1990, no estado do Rio de Janeiro e posteriormente foi identificado também em Tocantins, Alagoas e Ceará (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001). Atualmente existe transmissão de dengue em 20 Estados, com circulação simultânea dos sorotipos DEN-1 e DEN-2 em 14 deles (BRASIL, 2001).

Em 1997, a distribuição global da doença do dengue foi comparada a da malária e estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a transmissão do dengue (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2003).

1.3- Etiologia

O vírus do dengue é um membro da família *Flaviviridae* (LEBLOIS; YOUNG, 1995) que também compreende outros agentes causadores de doença severa como os vírus da febre amarela e os das encefalites Japonesa, "tick-borne" e St. Louis (WINKLER et al., 1988; HALL et al., 1990). Como os outros flavivirus, o vírus do dengue é esférico, com diâmetro de aproximadamente 40 a 50 nm e possui um envelope lipídico envolvendo o capsídeo que contém genoma do tipo RNA de fita simples e de polaridade positiva (HALL et al., 1990; FEIGHNY et al., 1994).

Milhões de infecções pelo vírus do dengue ocorrem a cada ano (GIBBONS; VAUGHN, 2002; GUZMÁN; KOURI, 2002), sendo causadas por

quatro sorotipos circulantes: DEN 1 – 4 (ROCCO et al., 2001; GIBBONS; VAUGHN, 2002; GUZMÁN; KOURI, 2002), sendo que o sorotipo DEN-4 ainda não foi encontrado no Brasil (FIOCRUZ, 2002). A infecção por um sorotipo produz imunidade duradoura contra reinfecção pelo mesmo sorotipo, mas somente uma proteção temporária e parcial contra os outros sorotipos (SABIN, 1952; GIBBONS; VAUGHN, 2002).

1.4- Ciclo de Transmissão do Vírus do Dengue

O ciclo de transmissão do vírus do dengue por *Aedes aegypti* ocorre no momento da picada, tanto do mosquito contaminado para a pessoa sã (através da saliva) quanto da pessoa contaminada para um mosquito sã (através do sangue) (FIOCRUZ, 2002; CDC, 2004). Para que isso ocorra, é necessário que o indivíduo apresente o vírus circulando no sangue - período denominado viremia e que dura em média cinco dias. Do momento em que picou o doente até tornar-se vetor permanente, passam-se de oito a 12 dias (PINHEIRO; ROSA, 1996; CDC, 2004; FERREIRA, 2004).

Após o mosquito contaminado picar uma pessoa sã, o vírus, assim que penetra em sua corrente sangüínea, passa a se multiplicar em órgãos específicos como baço, fígado e tecidos linfáticos – período denominado incubação intrínseca, com duração de quatro a sete dias. Após esse período, o vírus volta à corrente sangüínea gerando a viremia, que tem início antes do aparecimento dos primeiros sintomas (CDC, 2004; FERREIRA, 2004).

Outra forma possível de contaminação do mosquito é através da transmissão transovariana (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996; FIOCRUZ, 2002),

que ocorre quando a fêmea transmite o vírus para cerca de 30 ou 40% da sua prole, cujo ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (FIOCRUZ, 2002). A transmissão transovariana, mesmo em baixos níveis, poderia manter os vírus durante estações secas ou frias, quando não existem mosquitos adultos ou reservatório (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

O único animal reservatório a participar no ciclo transmissor do dengue é o próprio homem. Porém, estudos de campo na Malásia documentaram manutenção de vírus do dengue em florestas, através de ciclos enzoóticos envolvendo mosquitos da copa de árvores *Aedes niveus* e macacos (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

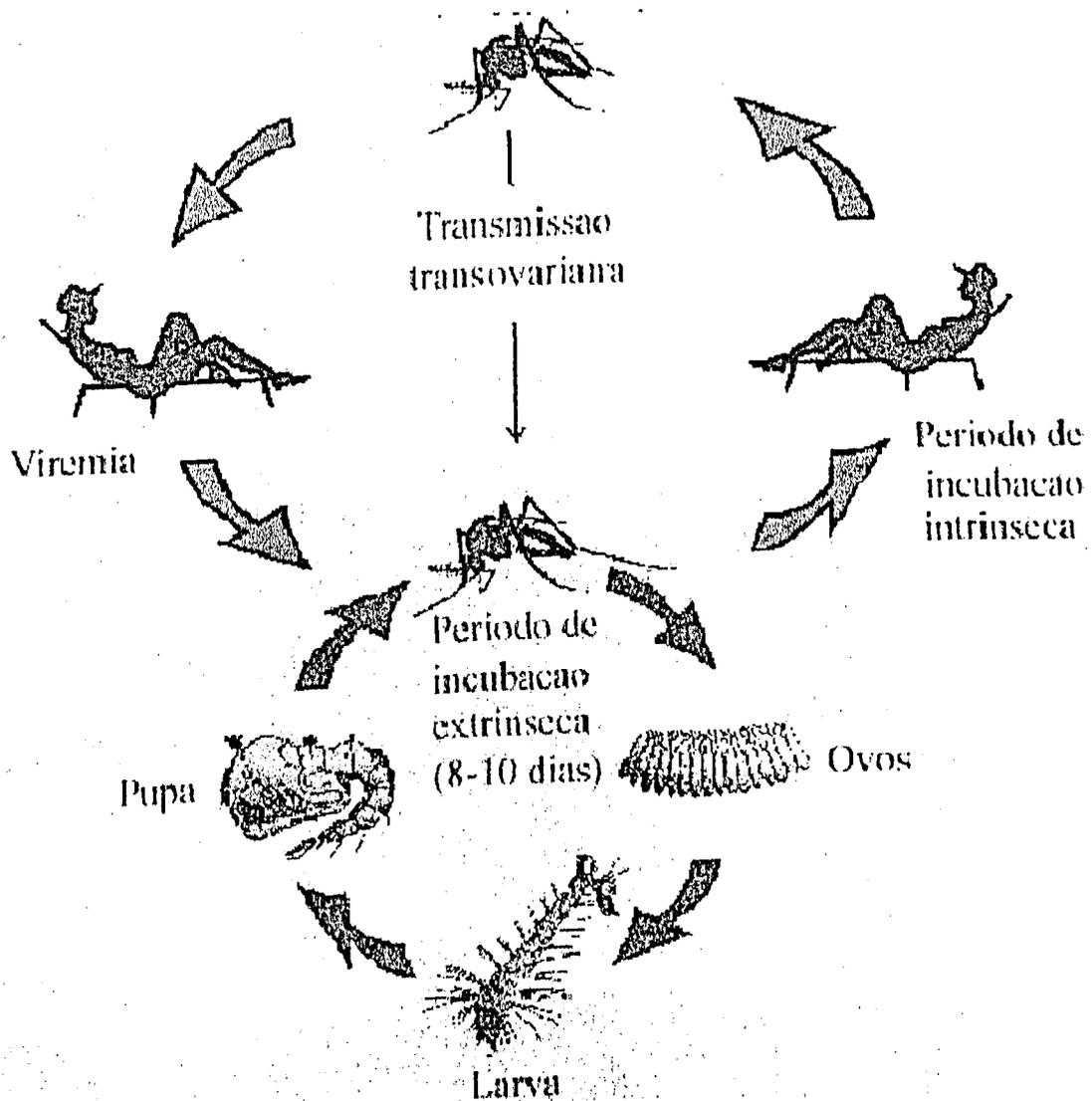


Figura 1: Ciclo biológico do vírus do dengue. Adaptado de:

<http://correo.biomedicas.unam.mx/~gmp/imagenes/Ciclo_biologico.JPG>

1.5- Proteínas do Virus do Dengue

O RNA viral codifica três proteínas estruturais e sete não estruturais na ordem 5' – C – prM – E – NS1 – NS2a – NS2b – NS3 – NS4a – NS4b – NS5 – 3' (WINKLER et al., 1988; FEIGHNY et al., 1994).

A proteína do capsídeo C é uma proteína viral pequena de peso molecular de 12-14 kDa. Essa proteína associada com o RNA viral forma o nucleocapsídeo dos flavivirus (MARKOFF, 1989; PRYOR; WRIGHT, 1994).

Duas formas da proteína M têm sido caracterizadas: a prM, em vírions imaturos e a proteína M, em vírions maduros extracelulares. A prM (18,1-19,1 kDa) é a precursora da proteína M (7-9 kDa) (VÁZQUEZ et al., 2002) e impede que a proteína E sofra mudanças conformacionais (PRYOR; WRIGHT, 1994) a partir da estabilização de certos epítomos sensíveis ao pH (WANG et al., 1999).

A proteína E, que compõe o envelope, é a maior proteína estrutural da partícula viral com peso molecular de 53 a 58 kDa. É uma proteína importante na fusão celular, indução de anticorpos neutralizantes (HUNG et al., 1999), imunidade protetora, produção de anticorpos que inibem a aglutinação de eritrócitos (GUZMÁN; KOURI, 2002) além de ser um dos antígenos mais importantes para o diagnóstico da doença (SMITH; WRIGHT, 1985; HEINZ, 1986). A presença de anticorpos contra essa proteína, em infecções naturais pelo vírus do dengue, parece estar associada com o desenvolvimento da forma grave da doença, a febre hemorrágica do dengue (KUNO et al., 1990). É a glicoproteína mais provável para o desenvolvimento de uma vacina (HUNG et al., 1999; KONISHI; FUJII, 2002).

A NS1 (46 kDa), é uma glicoproteína não estrutural encontrada tanto no meio intracelular, na forma associada à membrana, quanto no meio extracelular, sob a forma secretada (FALCONAR; YOUNG, 1990; CHANG et al, 2002). Foi primeiramente identificada em extratos cerebrais de camundongos, sob a forma extracelular e foi referida como antígeno solúvel fixador do complemento. Sua presença na superfície de células infectadas sugere sua importância na maturação dos flavivirus, apesar de sua exata função permanecer desconhecida (FALCONAR; YOUNG, 1990). Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 é a proteína responsável pela fixação de complemento (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

A NS5 é a maior proteína viral (103-105 kDa) e é altamente conservada, não contendo seqüência hidrofóbica longa (MANDL et al., 1989). Já a NS3 é a segunda maior proteína viral (68-70 kDa) e tem importante papel na replicação viral (SPAUDING et al., 1999).

Já as glicoproteínas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b são menos conservadas e suas funções no vírus ainda não são bem conhecidas (FEIGHNY et al., 1994).

Dentre essas proteínas, a prM, a E e a NS1 têm sido consideradas ser importantes na imunidade protetora, uma vez que camundongos imunizados passivamente com anticorpos contra cada uma dessas proteínas ficaram protegidos contra o desafio letal (KONISHI; FUJII, 2002).

Esse achado é de especial interesse porque demonstra que a proteção imune à infecção viral pode ser obtida não somente com anticorpos neutralizantes a proteínas estruturais, como é comumente observado, mas no

caso dos flavivirus, também com anticorpos contra proteínas não-estruturais (WINKLER et al, 1988).

1.6- Aspectos Clínicos

Clinicamente a infecção pode ser assintomática, quando a pessoa infectada não apresenta sintomas da doença (FIOCRUZ, 2002), ou sintomática, quando o paciente manifesta uma doença febril indiferenciada, conhecida como febre do dengue (DF) ou febre hemorrágica do dengue (DHF) que, em sua manifestação mais grave, pode levar à síndrome de choque do dengue (DSS), podendo levar à morte (ROCCO et al., 2001).

Na febre do dengue, os sintomas costumam surgir de três a 15 dias após a picada do mosquito (FIOCRUZ, 2002) e são semelhantes a de um resfriado como febre, calafrios, dores de cabeça e mialgia (ROCCO et al., 2001). Manchas pelo corpo, linfadenopatia, artralgia ou mialgia usualmente acompanham os sintomas iniciais (GROEN et al., 2000; BALMASEDA et al., 2003).

Na febre hemorrágica do dengue e na síndrome do choque do dengue, os primeiros sintomas são semelhantes ao da febre do dengue. De três a cinco dias depois, no entanto, o doente tende a apresentar uma breve e aparente melhora seguida por agravamento dos sintomas e por sinais de debilidade profunda: suores, palidez, agitação ou letargia, extremidades do corpo frias, pulso fraco e hipotensão (FIOCRUZ, 2002). Como a DHF é caracterizada pelo extravazamento do plasma, é considerada a forma grave da doença (GROEN et al., 2000). A manifestação clínica da forma grave do dengue é mais

freqüente quando uma pessoa se infecta por um sorotipo e se reinfecta por outro sorotipo, devido à presença de anticorpos heterólogos ou heterotípicos (ROCCO et al., 2001; MINAS GERAIS, 2002), que agiriam como facilitadores da infecção de macrófagos, levando à patogênese da doença da DHF (HALSTEAD, 1970).

A principal característica fisiopatológica da DHF que a diferencia da DF é o extravasamento do plasma, devido a um aumento da permeabilidade vascular. Essa efusão de plasma leva à hemoconcentração, que se manifesta através de valores crescentes do hematócrito (BRASIL, 1996). Evidencia-se também a trombocitopenia (plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$) (BRASIL, 2002a) e tendências hemorrágicas por pelo menos uma das seguintes manifestações: prova do laço positiva^a, petéquias, equimoses, púrpura, sangramento do trato gastrointestinal, de mucosas e outros (BRASIL, 2002b).

^a A prova do laço é realizada inflando-se o manguito do esfigmomanômetro na pressão média entre a pressão arterial máxima e a mínima do paciente, mantendo-se esta pressão por cinco minutos. Quando positiva, aparecem petéquias sob o aparelho ou abaixo do mesmo. Se o número de petéquias for de 20 ou mais por polegada ($2,3 \text{ cm}^2$), essa prova é considerada fortemente positiva. O teste pode ser negativo ou levemente positivo durante a fase de choque, tornando-se positivo na fase de recuperação do choque (MINAS GERAIS, 2002).

Além de preencher os critérios acima, os casos de DHF são classificados em quatro categorias, segundo a Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2002b):

Grau I - Febre acompanhada de sintomas inespecíficos em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva;

Grau II - Grau I e hemorragias espontâneas leves (pele, gengiva e nariz);

Grau III - Pulso fraco e rápido, queda da pressão arterial (PA), pele pegajosa e fria, e inquietação. Refere-se ao princípio da DHF;

Grau IV - Choque profundo com ausência de PA e pressão de pulso imperceptível. Mesmo não havendo sangramento aparente ou generalizado, o paciente corre sério risco de vida.

A emergência do dengue hemorrágico é particularmente evidente no Brasil. Cerca de 80% dos casos de dengue hemorrágico notificados nas Américas ocorrem no Brasil, e nos últimos anos, dados cumulativos mostraram que mais de 1 milhão de casos foram reportados em todo o país (DOS SANTOS et al.; 2002).

1.7- Patogênese da DHF

As primeiras células a serem infectadas pelo vírus do dengue são monócitos sanguíneos/macrófagos tissulares (HALSTEAD, 1970; FEIGHNY et al., 1994; ROTHMAN; ENNIS, 1999). Estas células parecem agir como carreadores para a disseminação do vírus a diferentes tecidos, fato este que pode explicar os sintomas sistêmicos observados no dengue bem como o

envolvimento de diferentes células na produção de citocinas (ANDERSON et al., 1997).

Citocinas são secretadas por dois subgrupos diferenciados de células *Thelper* CD4⁺: células Th1 e células Th2. As células Th1 secretam IFN- γ , IL-2 e TNF- β e são responsáveis por reações inflamatórias mediadas por células, hipersensibilidade do tipo tardia, injúria tecidual em infecções e doenças auto-imune. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e auxiliam a produção de anticorpos pelas células B. A regulação de Th1 e Th2 é mediada por IL-10 e IFN- γ , respectivamente (CHATURVEDI et al., 2000; ABBAS et al., 2002a).

Em infecções virais, como aquelas causadas pelos vírus Herpes simplex ou Influenza, a resposta do tipo Th1 está relacionada com a recuperação da infecção, enquanto que a resposta do tipo Th2 tende a levar à patologia severa e exacerbação da doença (MOSMANN; SAD, 1996). Já no caso de infecções pelo vírus do dengue, as respostas Th1 estão relacionadas com casos de DF e as respostas Th2 com o grau IV da DHF (CHATURVEDI et al., 2000).

Chaturvedi et al. (2000) propuseram um mecanismo que pode explicar a patogênese da DHF, onde o vírus do dengue ao replicar no macrófago faz com que estas células sofram maturação e apresentem os antígenos virais a linfócitos T, os quais rapidamente produzem uma citocina denominada hCF (fator citotóxico humano). O hCF induz os macrófagos a produzirem intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, tais como radicais livres, nitrito, oxigênio reativo, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. Os radicais livres além de matarem as células alvo por apoptose também regulam positivamente a

produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-8 . A mudança nos níveis relativos de IL-12 e TGF- β altera o perfil de resposta Th1 para Th2 resultando na exacerbação da doença do dengue e morte dos pacientes (Figura 2).

Os macrófagos infectados com o vírus do dengue ao apresentarem os antígenos virais aos linfócitos T também induzem essas células a sintetizarem citocinas indutoras da proliferação de células B, células precursoras dos anticorpos IgM e IgG (ABBAS et al., 2002a). Esses anticorpos ao se ligarem aos antígenos de superfície dos macrófagos infectados, sofrem uma alteração de forma que permitem a ligação e ativação da proteína do sistema complemento denominada C1, em duas ou mais porções Fc da imunoglobulina, processo que inicia a cascata do complemento (ABBAS et al., 2002b). A ativação de C1 ativa e cliva outras proteínas do complemento, cujos fragmentos proteolíticos (C5a, C4a, C3a) induzem inflamação aguda ao se ligarem nos mastócitos, provocando degranulação dessas células com liberação de mediadores vasoativos como a histamina (ABBAS et al., 2002b).

A permeabilidade vascular é aumentada devido a efeitos combinados de histamina, radicais livres (CHATURVEDI et al., 2000), citocinas pró-inflamatórias (HALSTEAD, 1970; ROTHMAN; ENNIS, 1999; CHANG et al., 2002) e produtos do complemento (HALSTEAD, 1970; ROTHMAN; ENNIS, 1999; CHATURVEDI et al., 2000).

Esse tipo de resposta imune leva a um aumento do hematócrito, a uma queda da pressão arterial, ao choque hipovolêmico e manifestações hemorrágicas associadas à plaquetopenia (MINAS GERAIS, 2002). Esses

fatores explicariam a presença de DHF em crianças menores de um ano de idade em uma primeira infecção por esse arbovírus, uma vez que os anticorpos maternos ainda circulantes teriam papel semelhante aos obtidos por uma infecção natural prévia (HALSTEAD, 1970).

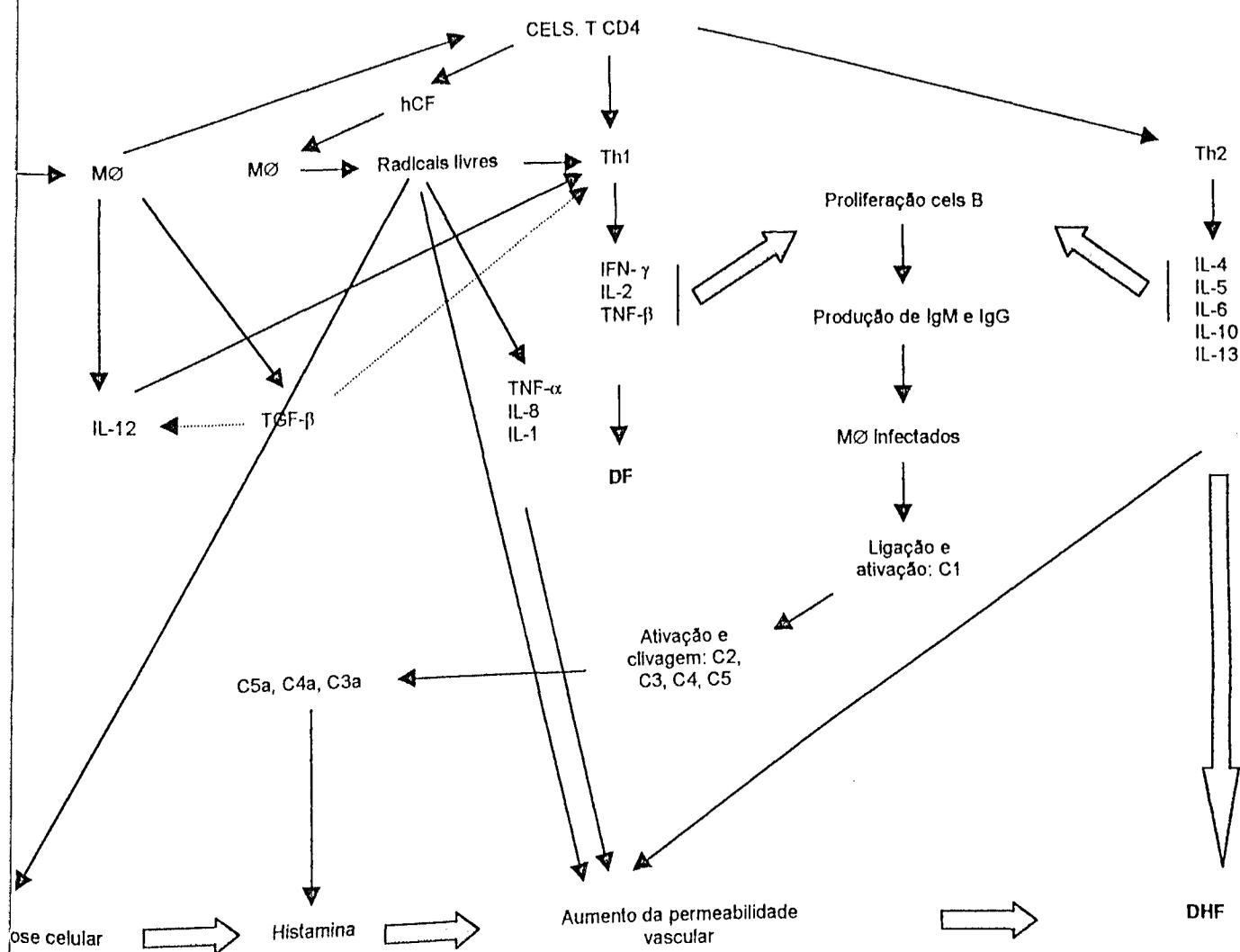


Figura 2. Cascata de citocinas induzida pelo vírus do Dengue (Modificado de CHATURVEDI et al., 2000). VD - vírus do dengue; hCF - fator citotóxico humano; DF - febre do dengue; DHF - Febre hemorrágica do dengue.

1.8- Fatores de Risco para DHF

Algumas teorias têm sido desenvolvidas para explicar a ocorrência das formas hemorrágicas do dengue (FIOCRUZ, 2002).

A teoria imunológica de Halstead (proposta em 1970) afirma que a ocorrência de DHF está associada a duas infecções sequenciais por diferentes sorotipos, após ter transcorrido um tempo mínimo entre elas de aproximadamente três anos (TEIXEIRA et al., 1999; FIOCRUZ, 2002). Isso aconteceria pelo fato da resposta imunológica do indivíduo sensibilizado ser amplificada pela segunda infecção, devido à existência prévia de anticorpos heterotípicos (TEIXEIRA et al., 1999; GIBBONS; VAUGHN, 2002).

De acordo com Rigau-Pérez et al. (1998) e Rothman e Ennis (1999), esses anticorpos heterotípicos formam complexos com o vírus do dengue, os quais são reconhecidos mais facilmente pelos monócitos e macrófagos do que as partículas de vírus não complexadas. Esse fenômeno tem sido denominado resposta amplificada dependente de anticorpo (ADE).

A segunda teoria (proposta em 1977), defendida por Rosen, relaciona as formas graves da doença a uma maior virulência de determinadas cepas do vírus (TEIXEIRA et al., 1999; FIOCRUZ, 2002; GIBBONS; VAUGHN, 2002).

Como as teorias de Halstead e de Rosen não explicam de forma isolada os eventos epidemiológicos que vêm ocorrendo no mundo, uma terceira teoria propõe, de forma integral, a multicausalidade, segundo a qual se interligam vários fatores de risco: individuais, virais e epidemiológicos (Figura 3). A interseção dos três fatores determina a ocorrência da DHF (KOURI et al., 1987, TEIXEIRA et al., 1999; GUZMAN; KOURI, 2002).

Uma proporção muito variável de casos de DHF pode estar associada à integração dos três fatores de risco, destacando-se: (1) o número de sorotipos e o tempo em que estão circulando em cada espaço, (2) a magnitude das epidemias de DF anteriores e atuais que determinam o estado imunológico das populações expostas a novas infecções, (3) as diferenças genéticas entre as cepas, (4) os atributos pessoais como raça e idade dos indivíduos e (5) a qualidade e cobertura dos sistemas de saúde de cada país (TEIXEIRA et al., 1999).

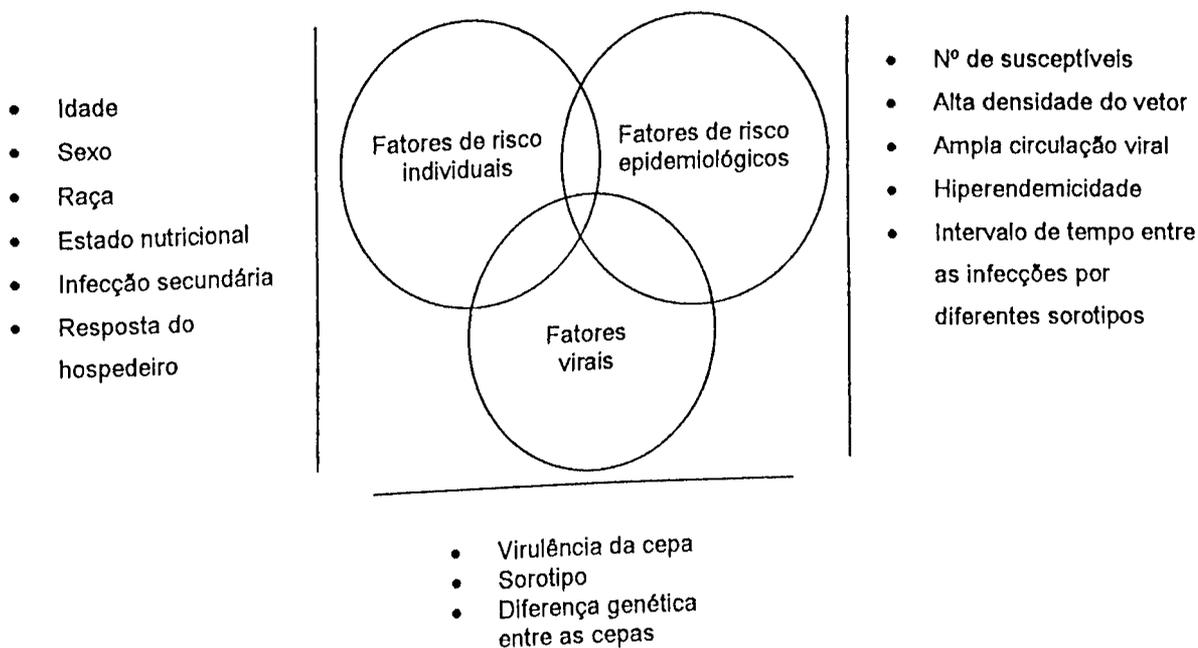


Figura 3. Fatores de risco para DHF: uma hipótese integrada. (Modificado de Kouri et al., 1987).

No geral, os fatores epidemiológicos e virais são determinantes para a epidemia da doença. Fatores de risco individuais como sexo, raça e doenças crônicas são fatores que predispõem a doença ser mais freqüente em certa raça ou grupo de idade. No entanto, a pré-existência de anticorpos é o principal fator de risco individual, mas não o único para a ocorrência da doença severa. A presença ou ausência dos fatores de risco individuais determina se as pessoas com infecção secundária apresentam as características clínicas da DHF (GUZMAN; KOURI, 2002).

Os riscos da DHF são extremamente grandes quando a doença é hiperendêmica, com circulação simultânea de múltiplos sorotipos do vírus do dengue dentro da população (BRANCH; LEVETT, 1999), sendo mais freqüente em crianças acima de 15 anos de idade (GIBBONS; VAUGHN, 2002).

1.9- Diagnóstico Laboratorial

Métodos de diagnóstico laboratorial são utilizados tanto para a identificação do vírus do dengue, tais como o isolamento do vírus, detecção do RNA viral usando a reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR), teste de neutralização (NT) como também para a detecção de anticorpos, tais como o MAC-ELISA e o *Western-blotting*.

O isolamento do vírus do dengue é sorotipo-específico, sendo realizado através da inoculação de sangue e derivados ou tecidos de pacientes em culturas celulares, camundongos *Swiss* recém-nascidos e mosquitos adultos ou larvas. Uma vez isolados, os vírus são identificados utilizando-se de anticorpos monoclonais sorotipo-específico, pelo teste de imunofluorescência indireta

(BRASIL, 1996). No entanto, o isolamento do vírus pode ser comprometido pela dificuldade no transporte e estocagem apropriados, requisitos para proteger o vírus RNA, que é extremamente lábil (BALMASEDA et al., 2003).

A detecção do RNA viral pela RT-PCR no soro sangüíneo humano (De PAULA; FONSECA, 2002), amostras de tecidos e até mesmo no mosquito vetor (LANCIOTTI et al., 1992), já foi descrita para muitos flavivirus (KORAKA et al., 2002). De acordo com De Paula e Fonseca (2002), a RT-PCR tem se mostrado um método de diagnóstico sensível, específico e rápido em detectar pequenas quantidades de RNA viral em espécimes clínicos.

O NT, apesar de ser a reação de escolha para muitos flavivirus, já que é tipo- específica, consome tempo (KORAKA et al., 2002).

O ELISA de captura que detecta anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA) tem sido o método de escolha para os testes sorológicos de rotina porque, na maioria dos casos, é suficiente uma única amostra de soro. Além disso, a presença de IgM anti-dengue é útil para detectar o número de indivíduos recentemente infectados durante uma epidemia (BRASIL, 1996).

A detecção de IgA (AAC-ELISA) pode ser útil para determinar as taxas de infecção durante a epidemia da febre do dengue. Pelo fato do título de IgA decrescer rapidamente, ao contrário da IgM que pode persistir por 8 meses, há a indicação somente de indivíduos infectados durante o último mês. Desta maneira, testes sucessivos podem fornecer a progressão da epidemia (TALARMIN et al., 1998). Além disso, a detecção de IgA em infecções secundárias pode ser mais sensível que a detecção de IgM no soro (BALMASEDA et al., 2003).

De acordo com Miagostovich et al. (1999), o ELISA de captura que detecta anticorpos da classe IgG (GAC-ELISA), juntamente com o MAC-ELISA são os métodos mais precisos para determinar se o paciente está desenvolvendo uma infecção primária ou secundária, uma vez que o MAC-ELISA sozinho não revela a distinção entre essas duas respostas imunes.

A técnica de *Western-blotting* para caracterização de anticorpos contra proteínas do dengue é também empregada para determinar o perfil protéico dos sorotipos DEN-1 e DEN-2 (MENDES, 2000) e detectar respostas contra proteínas estruturais e não-estruturais simultaneamente (FEIGHNY et al., 1994; PRYOR; WRIGHT, 1994), apesar de não ser rotineiramente utilizada como método de diagnóstico laboratorial.

1.10- Tratamento

Não há tratamento específico para a dengue, o que o torna eminentemente sintomático ou preventivo das possíveis complicações. As drogas anti-virais, o interferon α e a gamaglobulina, testados até o momento, não apresentaram resultados satisfatórios que subsidiem sua indicação terapêutica (BRASIL, 2002a).

De acordo com Minas Gerais (2002), as considerações gerais para o tratamento incluem:

- Hidratação, devendo ser vigorosa e oral, quando o quadro permitir, ou venosa, nos casos graves;

- Evitar o uso de salicilatos (aspirina) e anti-inflamatórios não hormonais devido ao risco de sangramento. Opta-se, como medicação sintomática, pelo paracetamol ou dipirona;
- Caso haja suspeita de dengue hemorrágico, o paciente deverá ser hospitalizado e submetido, diariamente, à prova do laço, dosagem de plaquetas e hematócrito para detecção de alterações precocemente;
- Avalia-se necessidade de hemotransusão, no caso de sangramento importante ou queda brusca do hematócrito.

Como não há um tratamento específico para o dengue (BRASIL, 2002a), uma alternativa seria a produção de uma vacina segura e eficaz, o que ainda não foi possível (MINAS GERAIS, 2002; CDC, 2003; FERREIRA, 2004). Para ser eficiente, a vacina deverá ser tetravalente, ou seja, deverá proteger contra os quatro sorotipos de vírus do dengue existentes (FERREIRA, 2004). Uma vacina contra somente um sorotipo do vírus pode ser perigosa, pois caso o vacinado seja infectado na natureza por um outro sorotipo, a doença pode se manifestar de maneira mais severa (FERREIRA, 2004). Apesar de vacinas atenuadas estarem sendo desenvolvidas na Tailândia (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996; RIGAU-PÉREZ et al., 1998), essas vacinas apresentaram problemas de imunogenicidade e não podem ser combinadas em uma preparação tetravalente, pois seus títulos são muito baixos (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996). Uma vacina eficaz para o uso público não estará disponível pelos próximos 5 a 10 anos (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; CDC, 2003).

1.11- Justificativa

Apesar de décadas de pesquisa, a patogênese da infecção pelo vírus do dengue ainda é pouco entendida. Muitas hipóteses têm sido formuladas para explicar o desenvolvimento da febre hemorrágica do dengue (DHF) e da síndrome do choque do dengue (DSS) (KORAKA et al. 2001), como o desenvolvimento de complexos imunes, ativação do sistema complemento e seus produtos, citocinas, virulência do vírus e uma resposta amplificada por anticorpo (ADE) (CHATURVEDI et al, 2000). De acordo com Koraka et al. (2001), a resposta dependente de anticorpo (ADE) é a hipótese mais aceita.

Atualmente, muitos diagnósticos dos flavivirus são baseados em reações de imunofluorescência e imunoenzimáticas. Os flavivirus possuem epítomos de reação cruzada, o que constitui um problema nos diagnósticos sorológicos desses vírus, especialmente em regiões onde muitos flavivirus estão presentes. Isto sugere que as amostras devem ser testadas contra diferentes flavivirus para garantir um diagnóstico correto (KORAKA et al, 2002).

Além disso, pelo fato da febre do dengue apresentar sintomas inespecíficos (febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia, manchas na pele e, ocasionalmente, manifestações hemorrágicas), faz-se necessário testes de diagnóstico específicos para diferenciar o dengue de outras doenças, como a leptospirose, rubéola, influenza, malária ou infecção por *Rickettsia*, que podem ter apresentações clínicas similares (GROEN et al., 2000; BALMASEDA et al., 2003).

O uso de duas ou mais reações em conjunto fornece informações úteis para interpretar os resultados da sorologia para o vírus do dengue (TALARMIN

et al., 1998). A detecção de IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue no soro é uma ferramenta valiosa no diagnóstico da infecção pelo vírus do dengue, juntamente com os métodos tradicionais de detecção de IgM (KORAKA et al., 2001).

Apesar da necessidade de se desenvolver testes laboratoriais mais rápidos, específicos, sensíveis e baratos, os métodos de diagnóstico laboratorial para os vírus dengue são de extrema importância a fim de monitorar a introdução de novos sorotipos do vírus. Em uma população susceptível, a introdução de novos sorotipos do vírus é uma ameaça para a ocorrência de formas severas da doença. Além disso, a identificação dos vírus dengue, pelos testes laboratoriais já mencionados, é uma ferramenta essencial para que medidas sejam tomadas para prevenir e controlar novas epidemias (ROCCO et al, 2001).

Desde 1993, o setor de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Uberlândia, vem monitorando o aparecimento de casos com suspeita clínica de dengue. Desde então, as amostras clínicas são investigadas no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), mediante implantação de projeto de extensão pelo Prof. Dr. José Roberto Mineo.

A avaliação da reatividade dos isotipos de anticorpos (IgM, IgA e IgG) aos sorotipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) em circulação na cidade de Uberlândia, MG, poderão fornecer informações importantes para melhor compreender o mecanismo da patogênese desse vírus em humanos.

Além disso, não há estudos publicados, até então na literatura, relacionando a circulação dos sorotipos virais aos isotipos de anticorpos na infecção pelo vírus do dengue, por meio de ELISA de captura, utilizando o anticorpo monoclonal E4 6B6C-1 que reconhece um epítipo comum presente nos quatro sorotipos do vírus.

Objetivos

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Detectar anticorpos de diferentes isotipos na infecção pelo vírus do dengue e analisar o nível de reatividade desses anticorpos aos sorotipos virais DEN-1, DEN-2 e DEN-3.

2.2- Objetivos Específicos

- Padronizar reações imunoenzimáticas (ELISA de captura) para a detecção dos anticorpos das classes IgA e IgG contra três sorotipos do vírus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3), em amostras de soros humanos.

- Validar as reações imunoenzimáticas padronizadas para a presença de anticorpos dos isotipos IgM, IgA e IgG contra os três sorotipos do vírus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3), em amostras de soros de indivíduos com suspeita clínica da doença, colhidas nos anos de 1997, 2000 e 2003.

- Analisar o nível de reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítipo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos virais DEN-1, DEN-2 e DEN-3.

Material e Métodos

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- População de estudo e amostras de soros

Um total de 504 amostras de soro de pacientes com sinais e sintomas sugestivos de infecção pelo vírus do dengue, foram escolhidas aleatoriamente dentre as amostras coletadas entre os meses de janeiro a junho, durante os anos de 1997, 2000 e 2003, e enviadas para diagnóstico ao Laboratório de Imunologia, UFU, Uberlândia, MG. Dessa forma, 168 amostras foram analisadas para cada período estudado. Todas as amostras foram coletadas de pacientes atendidos em Centros de Saúde e Unidades de Atendimento Integrado (UAIs) da cidade de Uberlândia, MG, e de municípios vizinhos. Inicialmente, os espécimes clínicos foram coletados entre cinco dias e um mês após o aparecimento da sintomatologia clínica da doença, para os anos de 1997 e 2000. Já para o ano de 2003, a coleta das amostras de soros iniciou-se a partir do nono dia a um mês do surgimento dos sinais clínicos da infecção, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Setor de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde, Uberlândia, MG. Para cada amostra, foi preenchida uma ficha constando, dentre outros, os seguintes dados: procedência, idade, sexo, endereço, sintomas e início dos sintomas do paciente e data da notificação.

3.2- Antígenos do vírus do dengue

Os antígenos dos três sorotipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Arboviroses do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA, Brasil.

3.3- ELISA de captura para detecção dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue

Baseada no método já descrito para a detecção do isotipo IgM dengue-específico por ELISA de captura (MAC-ELISA), reações imunoenzimáticas de captura para IgA (AAC-ELISA) e para IgG (GAC-ELISA) foram submetidas à otimização, com algumas modificações (KUNO et al., 1990).

Microplacas de poliestireno com 96 poços (Thermo Labsystems, Franklin, MA, EUA), foram sensibilizadas (50µl/poço) separadamente com (1) anticorpos IgG de cabra anti-IgM humana (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) diluído a 1:500, (2) IgG de cabra anti-IgA humana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluído a 1:100 ou (3) IgG de cabra anti-IgG humana (preparado a partir do antisoro hiperimune purificado em coluna de afinidade Proteína A-Sepharose; Sigma Chemical Co.) diluído a 1:60 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6). Após incubação por 18 horas a 4 °C, as placas foram lavadas três vezes com salina tamponada fosfatada (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas (100µl/poço) com PBS acrescido de albumina sérica bovina (BSA) a 4% por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois de novos ciclos de lavagem com PBST, as placas foram incubadas com as amostras de soros (50 µl/poço), em duplicata, diluídas a 1:40 em PBS acrescido de BSA 0,5% (PBS-BSA) por 2h em temperatura ambiente. Paralelamente, soros controles positivos e negativos foram adicionados em cada reação. Após esse período, as placas foram lavadas novamente três vezes com PBST e, em seguida, uma mistura dos três sorotipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) diluída a 1:40 em PBS

contendo soro equino normal 20% foi adicionada (50 µl/poço) e incubada por 18 horas a 4 °C. Após novo ciclo de lavagem, o anticorpo monoclonal direcionado à glicoproteína E do vírus do dengue marcado com peroxidase (clone E4 6B6C-1; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA) foi adicionado às placas em uma diluição de 1:2000 em PBS contendo soro equino normal 20% (25 µl/poço) e incubado por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (100µl/poço) consistindo de ácido sulfônico 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazoline (ABTS Microwell Peroxidase Substrate System; Kirkegaard & Perry Laboratories). A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA).

Os níveis dos anticorpos foram arbitrariamente expressos como Índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula: $[IE = \text{média das DOs das amostras de soros} / \text{DO do cut off}]$, onde o *cut off* da reação foi determinado como a média das DOs obtidas dos controles negativos acrescida de três desvios-padrão (SILVA et al., 2002). Todas as amostras de soros com IE menor que 0,9 foram consideradas como resultado negativo. As amostras cujos IE permaneceram entre os valores de 0,9 e 1,1 (zona cinza) foram retestadas e somente as amostras de soros que apresentaram IE superior a 1,1 foram consideradas como resultado positivo.

3.4- Reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue

As amostras de soros consideradas positivas no ELISA de captura para os isotipos IgM, IgA e IgG ($IE > 1,1$) foram retestadas em um tipo alternativo de ELISA para verificar sua reatividade ao epítopo E4 presente nos sorotipos virais (DEN-1, DEN-2 e DEN-3), os quais foram adicionados separadamente às placas. Este ELISA alternativo (ELISA-univalente) permitiu comparações entre cada sorotipo individualmente, ao contrário da reação anterior que usou uma mistura dos três sorotipos virais (ELISA-trivalente). Dessa maneira, um protocolo similar foi adotado como descrito anteriormente, com as seguintes modificações. As amostras de soros foram adicionadas às placas em quadruplicata, de maneira que para cada amostra fosse testado: (1) a mistura dos três sorotipos virais; e os sorotipos isolados (2) DEN-1, (3) DEN-2 e (4) DEN-3. As etapas seguintes da reação foram realizadas como descrito para o ELISA-trivalente, com exceção para o conjugado marcado com peroxidase (mAb E4 6B6C-1), o qual foi diluído 1:1000 em PBS acrescido de soro equino normal 20% para as reações com os antígenos individuais. Valores da DO obtidos para cada isotipo de anticorpo foram arbitrariamente expressos como Índice de Reatividade (IR) e foram calculados pela divisão da DO obtida para cada amostra testada com os sorotipos individualmente pela DO obtida para a mesma amostra testada com a mistura dos três antígenos.

3.5- Análise estatística

Diferenças entre as porcentagens dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, obtidos pelo teste ELISA de captura nos diferentes anos, foram analisadas usando o teste de diferenças entre duas proporções (Statistic for Windows – versão 4.5 A - Statesoft, Inc., 1993). A média geométrica (mg) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) dos níveis dos isotipos foram determinados (GraphPad Prism 3,0, GraphPad Software, Inc.) e o teste de Mann-Whitney foi usado para comparar a diferença entre as médias dos níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue (GraphPad Prism 3,0, GraphPad Software, Inc.). Os coeficientes de correlação entre os níveis dos isotipos foram determinados usando o teste de correlação de Spearman (GraphPad Prism 3,0, GraphPad Software, Inc.). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.



Resultados

4- RESULTADOS

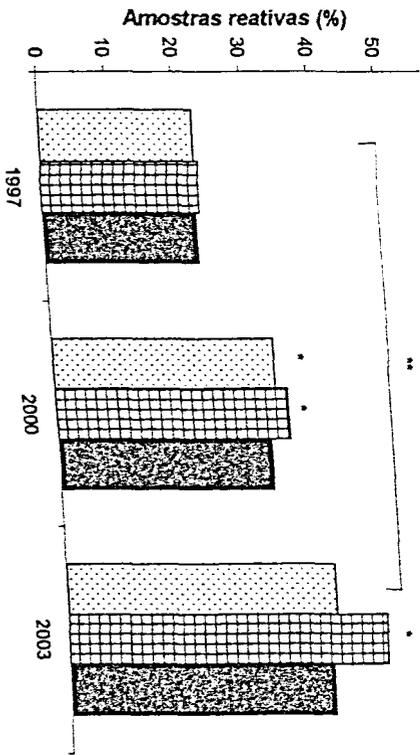
4.1- Positividade para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue

As taxas de positividade para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, detectados em 168 amostras de soros escolhidas aleatoriamente para cada ano estudado (1997, 2000 e 2003) estão demonstradas na Figura 4. Os isotipos IgM, IgA e IgG foram encontrados em 43/168 (26%), 39/168 (23%) e 42/168 (25%), respectivamente, dos soros analisados em 1997; 69/168 (41%), 57/168 (34%) e 58/168 (35%) em 2000; e 85/168 (50%), 67/168 (40%) e 83/168 (49%) em 2003. As taxas de positividade para todos os isotipos aumentaram significativamente de 1997 a 2003 ($P < 0,001$). Amostras positivas para os isotipos IgM e IgA mostraram um aumento significativo de 1997 a 2000 ($P < 0,05$), enquanto que a positividade para IgG aumentou significativamente de 2000 a 2003 ($P < 0,001$) (Fig. 4A).

Quando foi analisada a positividade concomitante para dois isotipos de anticorpos em 1997, 2000 e 2003 (Fig. 4B), amostras positivas para IgM/IgA (38/168 (23%), 55/168 (33%) e 67/168 (40%), respectivamente), IgM/IgG (39/168 (23%), 58/168 (35%) e 80/168 (48%), respectivamente) e IgG/IgA (38/168 (23%), 53/168 (32%) e 66/168 (39%), respectivamente) também apresentaram um perfil crescente de positividade para todos os períodos analisados. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre 1997 e 2000 para amostras positivas para IgM/IgA e IgM/IgG ($P < 0,05$). Diferenças similares também foram encontradas entre 2000 e 2003 para

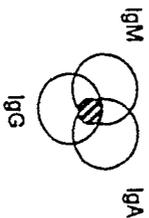
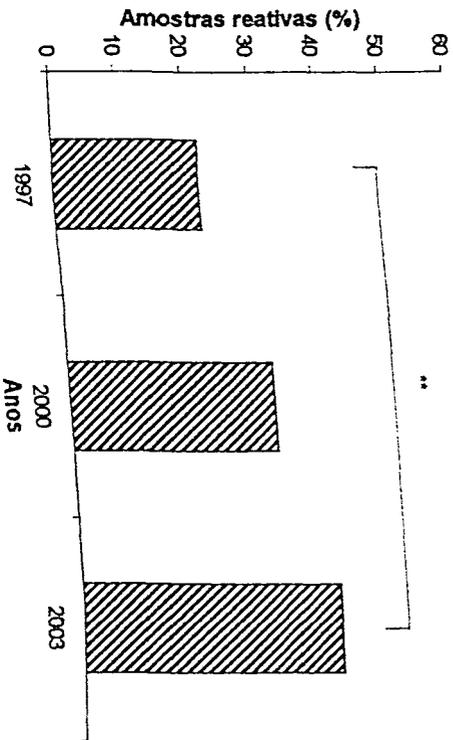
amostras positivas para IgM/IgG ($P < 0,05$), e entre 1997 e 2003 para todos os isotipos duplo-positivos analisados ($P < 0,01$).

Em relação à positividade concomitante para os três isotipos de anticorpos (Fig. 4C), isotipos triplo-positivos (IgM/IgA/IgG) foram encontrados em 37/168 (22%), 53/168 (32%) e 66/168 (39%) das amostras analisadas para os anos de 1997, 2000 e 2003, respectivamente. Neste caso também foi notado um aumento nas taxas de positividade entre esses períodos, mas diferença significativa foi encontrada somente quando os anos de 1997 e 2003 foram comparados ($P < 0,01$).



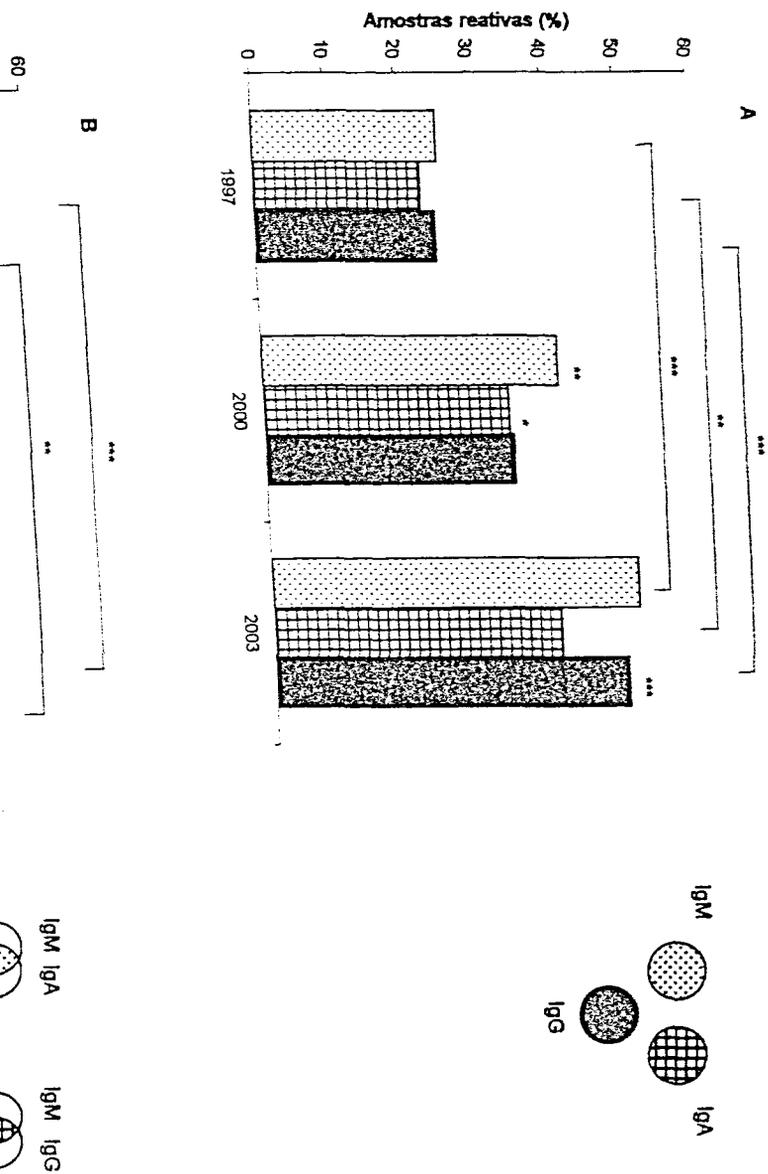
IgG IgA

C



IgM IgG

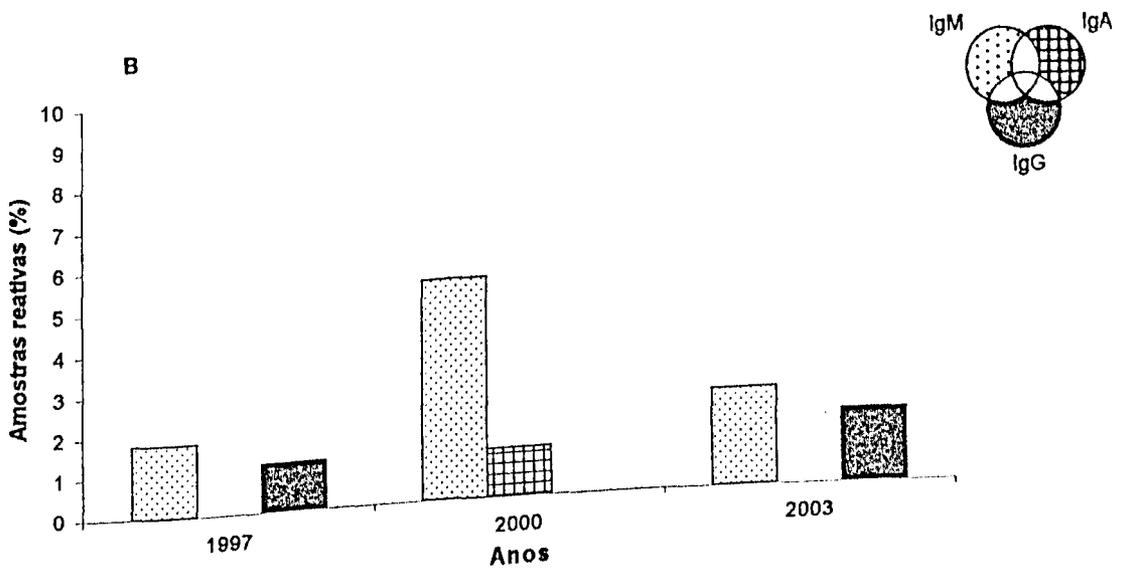
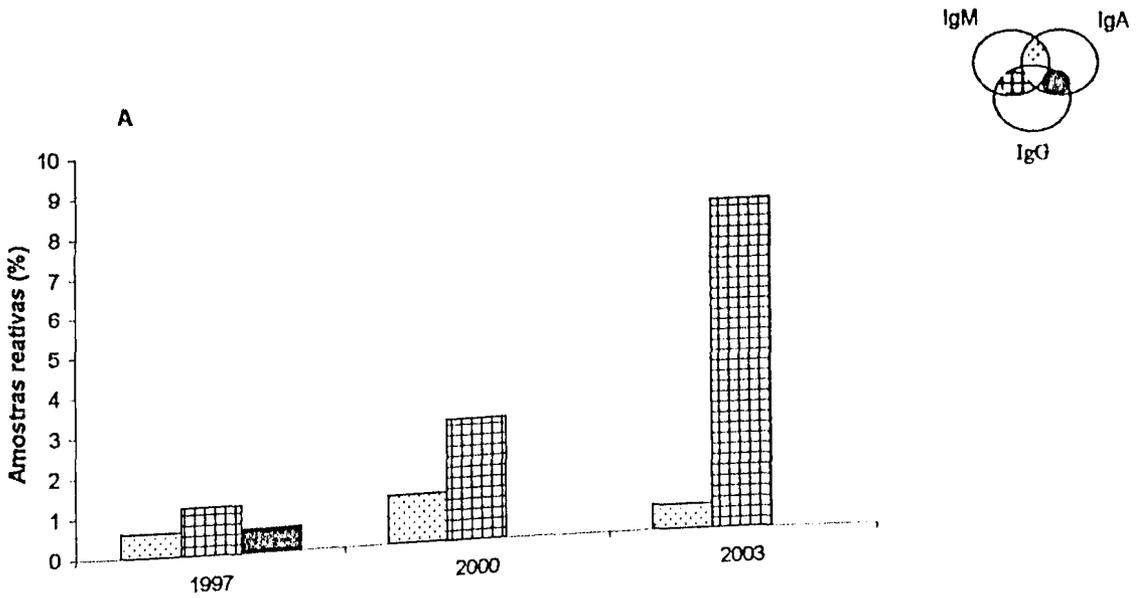
Figura 4



A Figura 5 ilustra as amostras reativas que apresentaram positividade restrita para dois isotipos (Fig. 5A) ou um único isotipo (Fig. 5B) em todos os períodos estudados. Foi observado que a positividade restrita para os isotipos de anticorpos é geralmente menos freqüente, mas positividade restrita para os isotipos IgM/IgG apresentou taxas crescentes [2/168 (1,2%), 5/168 (2,9%) e 14/168 (8,3%)] nos anos estudados. Positividade restrita para os isotipos IgG/IgA não foi encontrada em 2000 e em 2003 (Fig. 5A). Similarmente, a positividade restrita para um único isotipo (IgM, IgA ou IgG) é baixa, mas foi encontrada em taxas maiores para o isotipo IgM [3/168 (1,7%), 9/168 (5,3%) e 4/168 (2,4%) em 1997, 2000 e 2003, respectivamente]. A positividade restrita para o isotipo IgA não foi detectada em 1997 e 2003 (Fig. 5B).

Figura 5. Positividade restrita para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, detectados por ELISA de captura em 168 amostras de soros humanos escolhidas aleatoriamente para cada ano estudado (1997, 2000 e 2003) na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **(A)** Positividade restrita para dois isotipos: IgM/IgA, IgM/IgG ou IgG/IgA; **(B)** Positividade restrita para um único isotipo: IgM, IgA ou IgG.

Figura 5

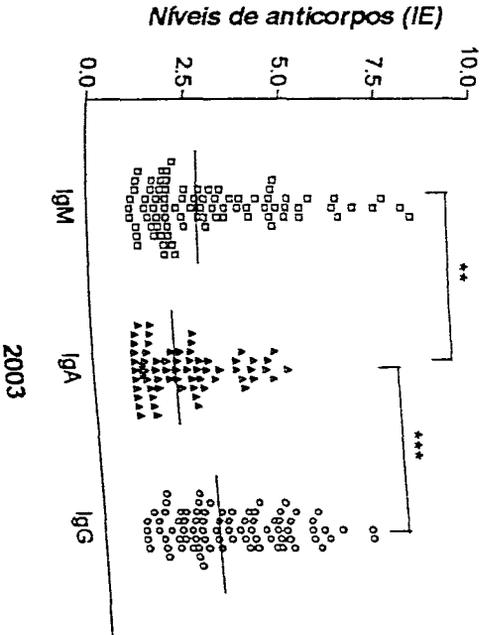


4.2- Níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue

Os níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, foram expressos em índice ELISA (IE) e analisados durante os anos selecionados para o presente estudo (Fig. 6). Níveis dos isotipos IgM e IgG foram significativamente maiores que os de IgA em 1997 (Fig. 6A) e 2003 (Fig. 6C) ($P < 0,01$), enquanto que os níveis de reatividade para os três isotipos não foram estatisticamente diferentes em 2000 (Fig. 6B). Além disso, níveis de IgM e IgG foram significativamente maiores em 1997 e 2003 do que em 2000 ($P < 0,001$) (Fig. 6D), enquanto que os níveis de IgA foram os mais baixos e não apresentaram diferença significativa entre os períodos analisados.

Figura 6. Níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, detectados por ELISA de captura em 168 amostras de soros humanos escolhidas aleatoriamente para cada ano estudado: 1997 **(A)**, 2000 **(B)** e 2003 **(C)**, na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. A média geométrica e o intervalo de confiança de 95% dos níveis dos anticorpos são mostrados em **(D)**. ****** $P < 0.01$; ******* $P < 0.001$.

C



D

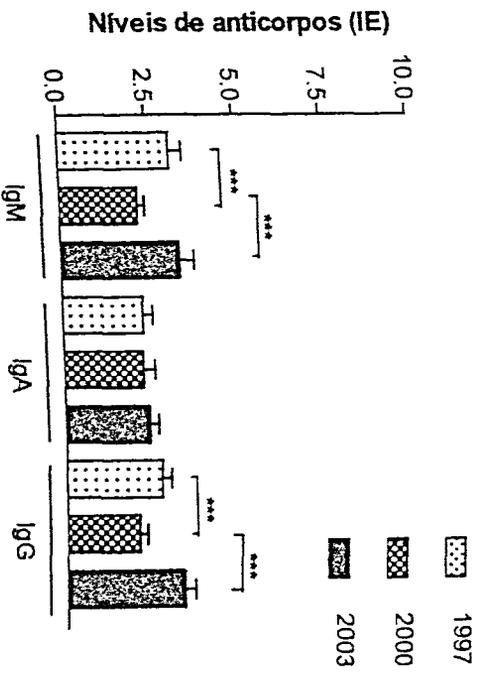
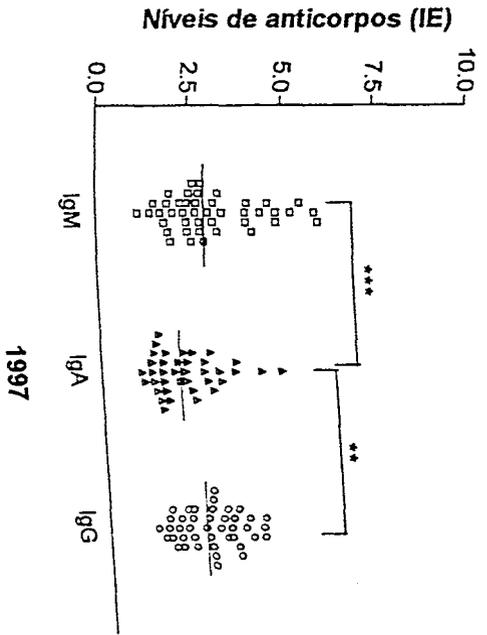
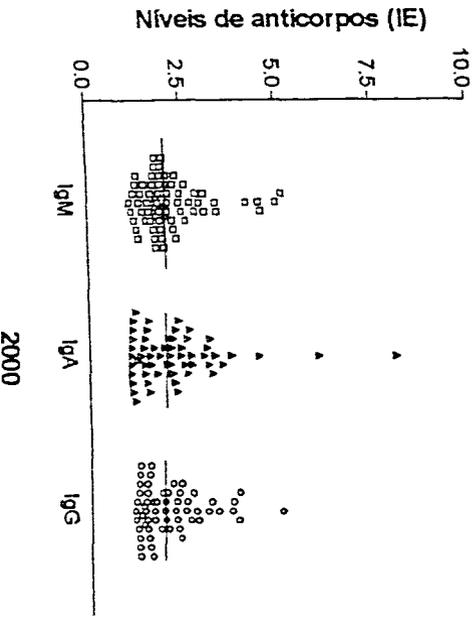


Figura 6

A



B



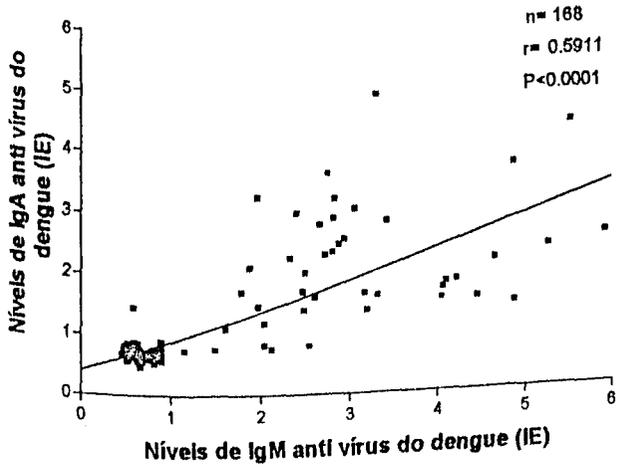
4.3- Correlação entre os níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue

As Figuras 7, 8 e 9 demonstram os resultados da correlação entre os níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue (IgA vs IgM, IgG vs IgM, IgG vs IgA) detectados por ELISA de captura em amostras de soros humanos analisadas em 1997, 2000 e 2003, respectivamente. Os níveis de anticorpos detectados por MAC-ELISA, AAC-ELISA e GAC-ELISA mostraram uma correlação positiva significativa em todos os períodos estudados, quando todas as amostras de soros foram analisadas ($P < 0,0001$) (Figs. 7A, 8A, 9A). Quando foram consideradas somente as amostras reativas ($IE > 1,1$), uma correlação positiva significativa foi encontrada somente para IgG e IgA em todos o períodos estudados ($P < 0,0001$). (Figs. 7B, 8B e 9B). Por outro lado, todos os isotipos de anticorpo foram significativamente correlacionados no ano de 2000 ($P < 0,05$) (Fig. 8B).

Figura 7. Correlação entre os níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue (IgA vs IgM, IgG vs IgM, IgG vs IgA), detectados por ELISA de captura em amostras de soros humanos escolhidas aleatoriamente para o ano de 1997, na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **(A)** Correlação utilizando todas as amostras de soros; **(B)** Correlação utilizando somente as amostras positivas ($IE > 1,1$).

Figura 7

A



B

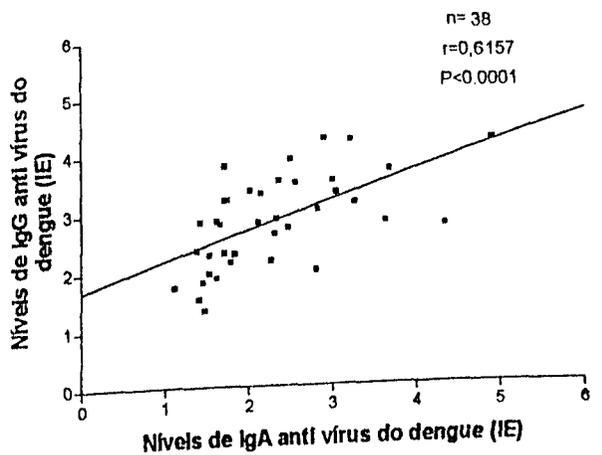
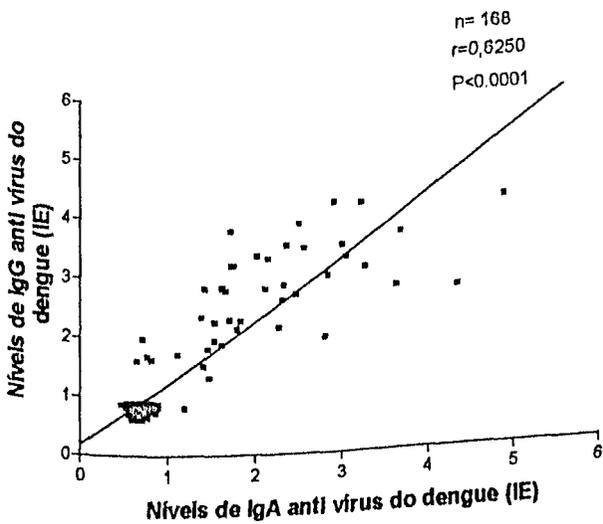
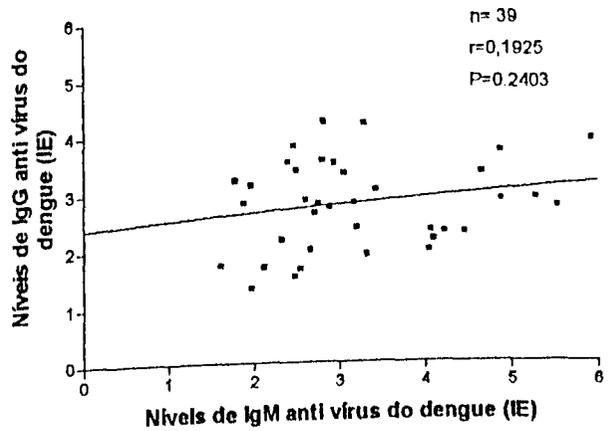
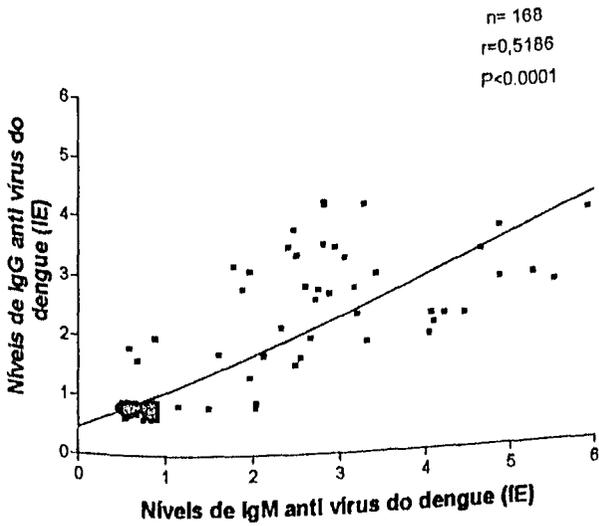
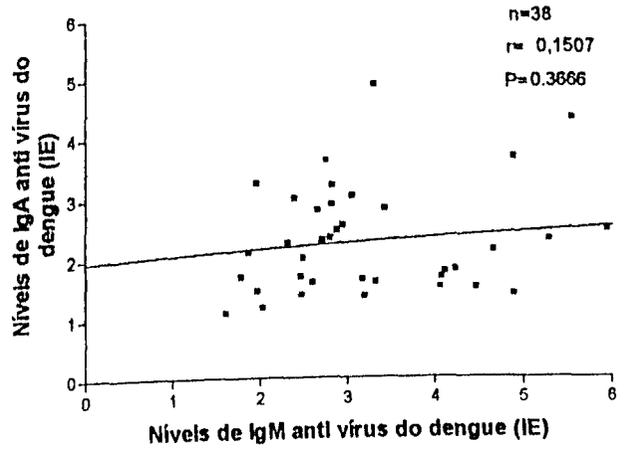
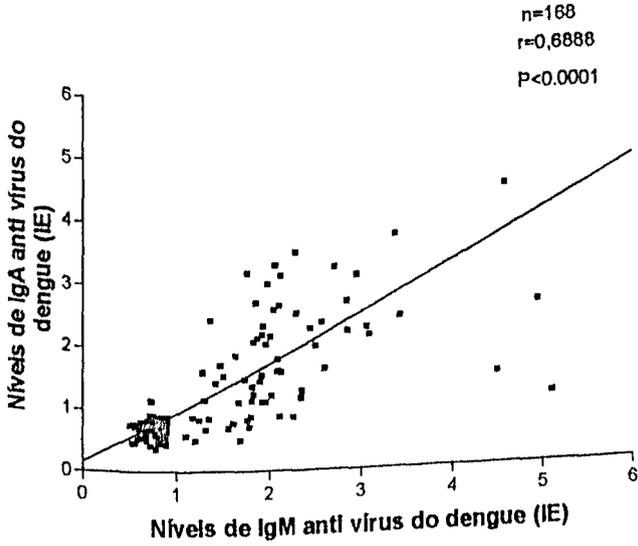


Figura 8. Correlação entre os níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue, (IgA vs IgM, IgG vs IgM, IgG vs IgA) detectados por ELISA de captura em amostras de soros humanos escolhidas aleatoriamente para o ano de 2000, na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **(A)** Correlação utilizando todas as amostras de soros; **(B)** Correlação utilizando somente as amostras positivas (IE > 1,1).

Figura 8

A



B

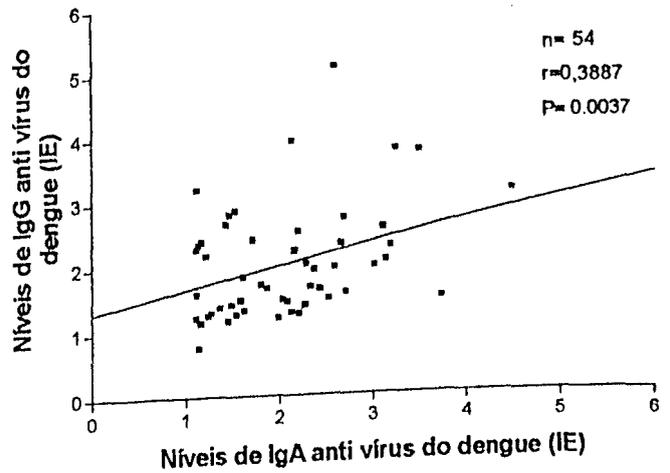
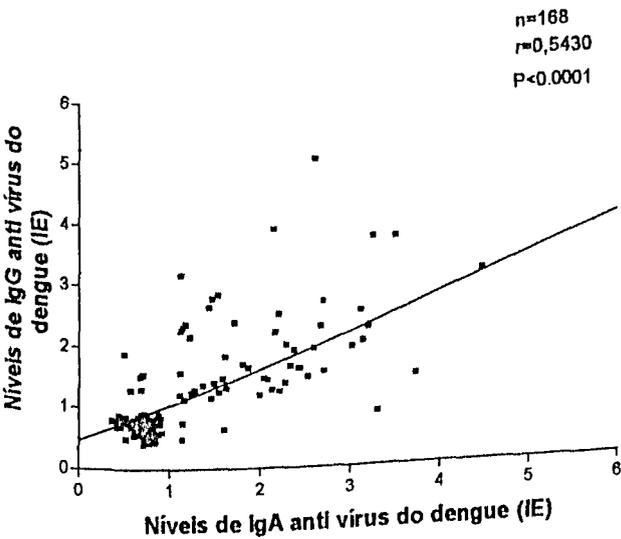
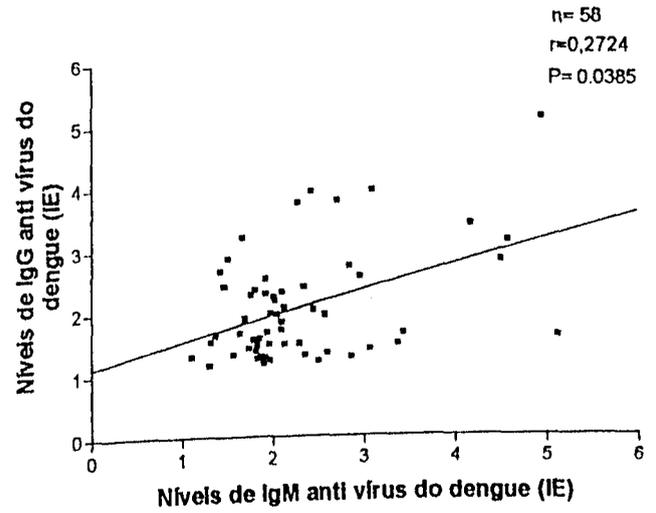
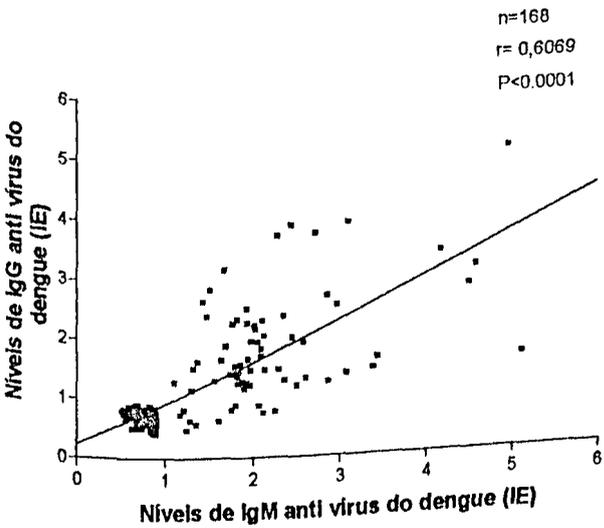
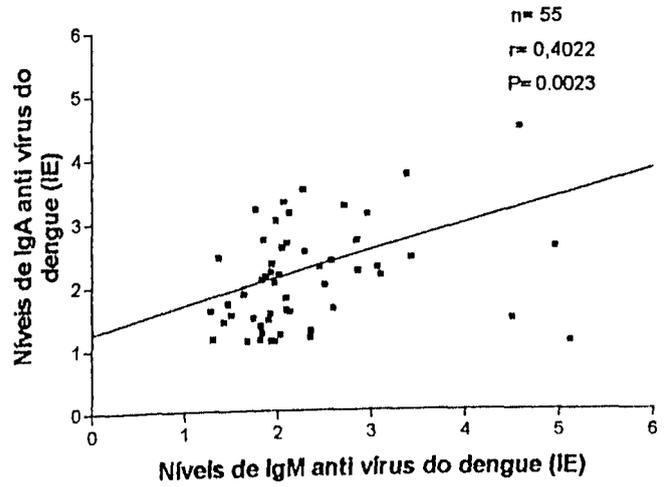
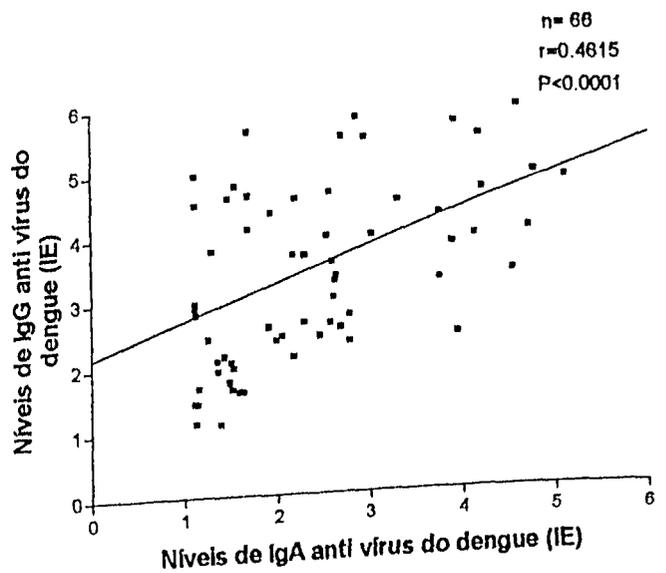
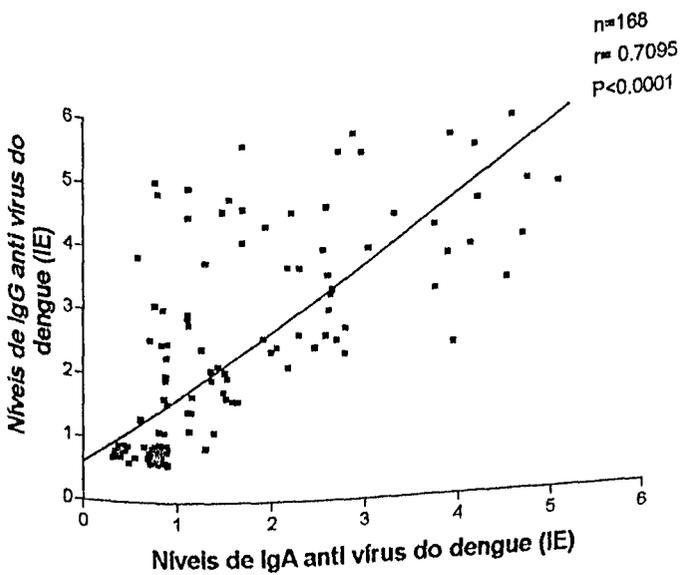
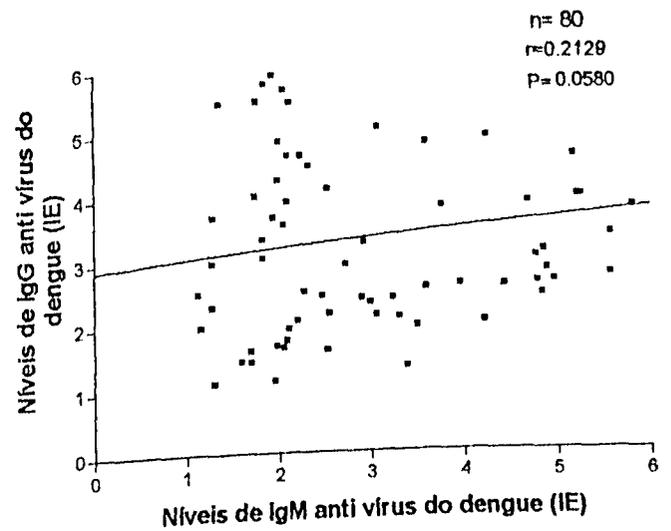
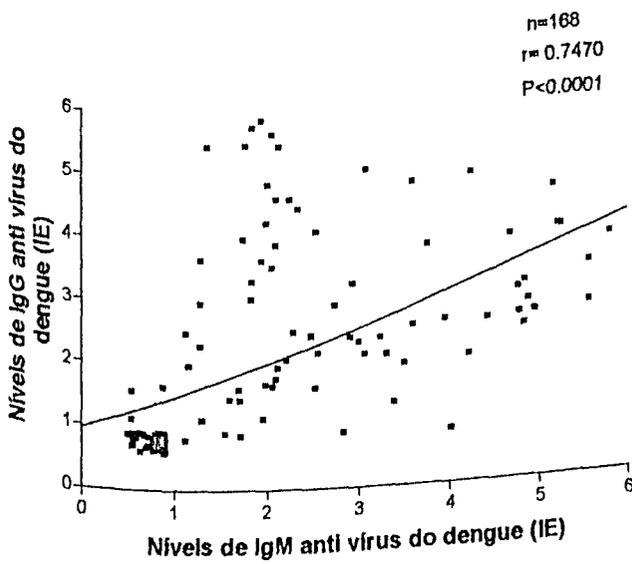
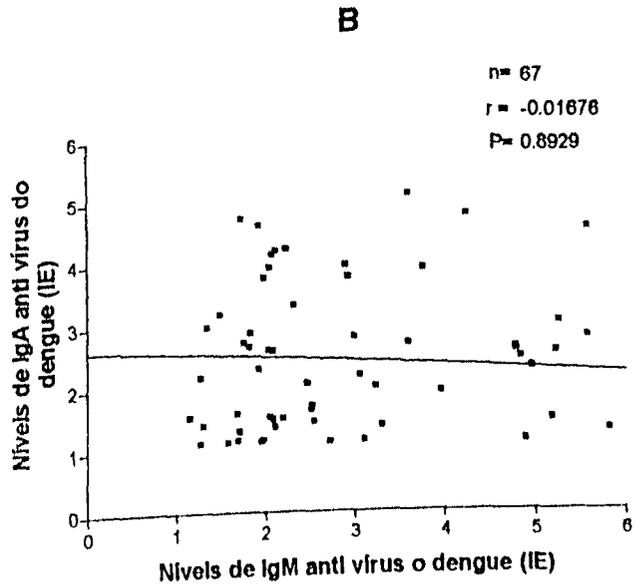
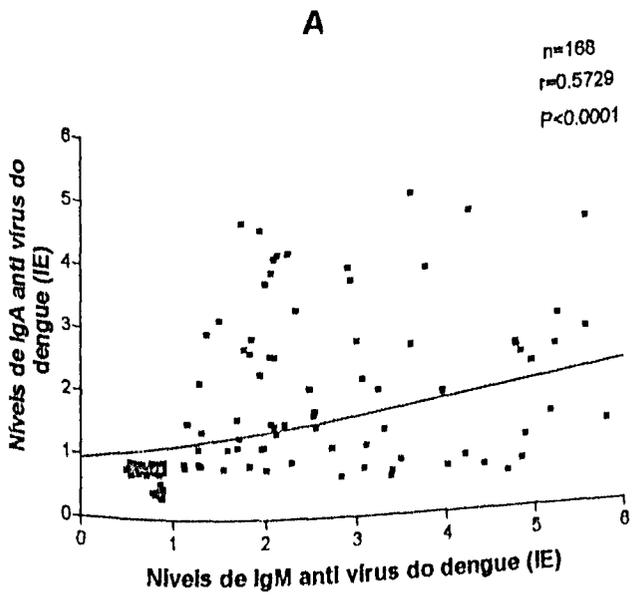


Figura 9. Correlação entre os níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue, (IgA vs IgM, IgG vs IgM, IgG vs IgA) detectados por ELISA de captura em amostras de soros humanos escolhidas aleatoriamente para o ano de 2003, na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **(A)** Correlação utilizando todas as amostras de soros; **(B)** Correlação utilizando somente as amostras positivas (IE > 1,1).

Figura 9



4.4- Reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue

O grau de reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítopo E4 presente nos sorotipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3), analisado pelo ELISA-univalente, para cada ano estudado (1997, 2000 e 2003), está ilustrado na Figura 10.

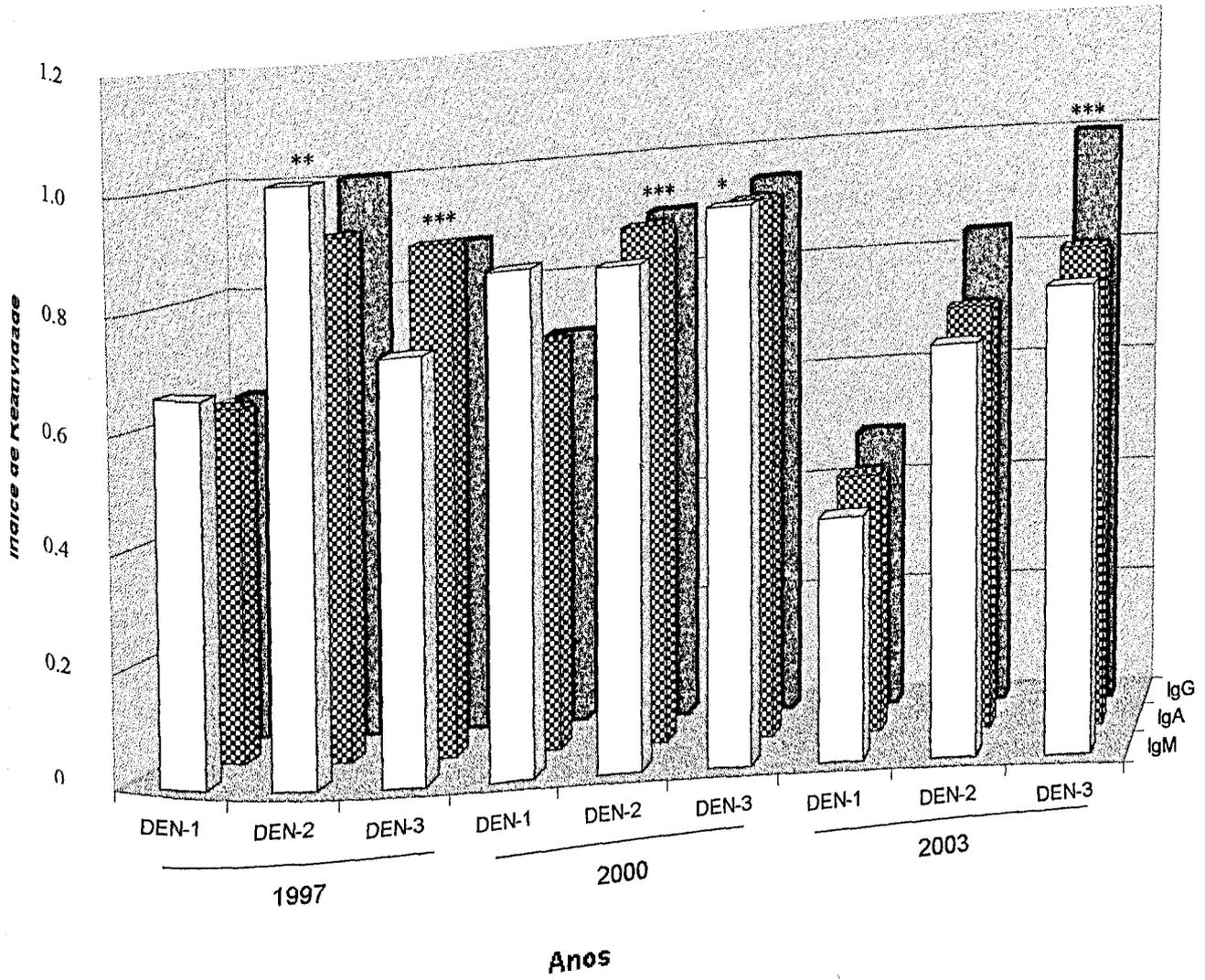
Diferenças importantes foram observadas durante os períodos de tempo estudados. Em 1997, IgM reagiu predominantemente com o epítopo E4 presente no sorotipo DEN-2 quando comparado ao DEN-1 ($P < 0,0001$) e DEN-3 ($P < 0,001$), enquanto que IgA e IgG reagiram principalmente com o epítopo E4 presente nos sorotipos DEN-2 e DEN-3 em relação ao DEN-1 ($P < 0,0001$). Assim, o epítopo E4 presente em DEN-1 apresentou a menor reatividade para todos os isotipos, enquanto que o mesmo epítopo presente em DEN-2 foi o mais reativo para IgM, IgA e IgG.

Em 2000, IgM reagiu predominantemente com o epítopo E4 presente no sorotipo DEN-3 ($P < 0,05$), enquanto que IgA e IgG continuaram reagindo mais intensivamente com este epítopo presente nos sorotipos virais DEN-2 e DEN-3 ($P < 0,0001$). Portanto, o epítopo E4 presente em DEN-2 e DEN-3 foi mais reconhecido pelos isotipos de anticorpos neste período.

Em 2003, no entanto, uma modificação significativa foi observada no padrão de reatividade para o epítopo E4 presente nos sorotipos virais, considerando que este epítopo presente em DEN-3 foi mais reconhecido por todos os isotipos de anticorpos estudados ($P < 0,001$).

Figura 10. Reatividade dos isotipos IgM, IgA e IgG ao epítipo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3), detectada por ELISA de captura em amostras positivas de soros humanos para cada ano (1997, 2000 e 2003) na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

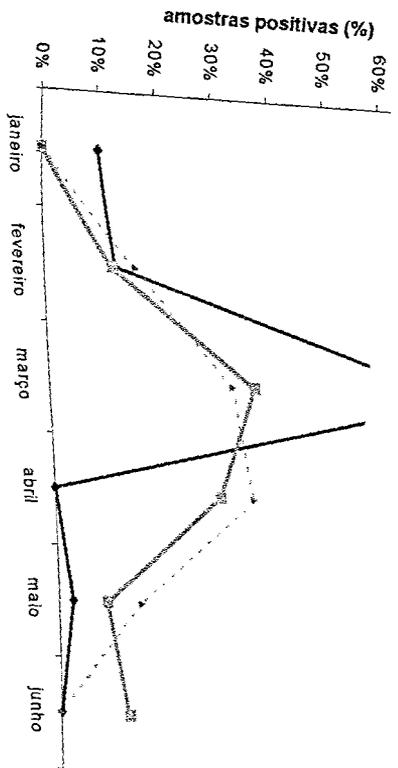
Figura 10



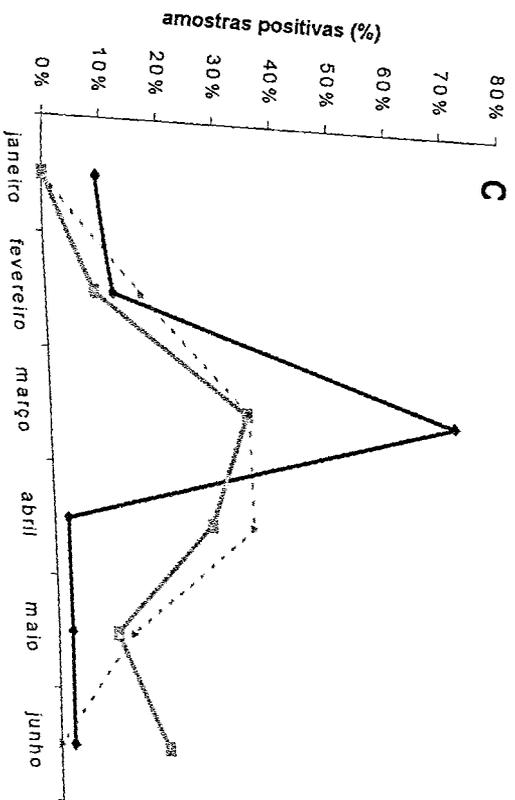
4.5- Distribuição das amostras de soro reativas para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue

A figura 11 ilustra a distribuição das amostras reativas para IgM (Fig. 11A), IgA (Fig. 11B) e IgG (Fig. 11C), durante os meses de 1997, 2000 e 2003. Foi observado que o pico de positividade das amostras ocorreu no mês de março, para todos os anos analisados, independentemente do isotipo de anticorpo. Comportamento diferente foi observado no ano de 1997, pois foi o período que apresentou um maior pico de positividade no mês de março (aproximadamente 70% para todos os isotipos de anticorpos) e nenhuma amostra reativa no mês de abril, quando comparado aos anos de 2000 e 2003, os quais ainda demonstraram altas taxas de positividade neste mês.

Figura 11. Distribuição das amostras de soro reativas ($IE > 1,1$) para os isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, durante os meses de janeiro a junho de 1997, 2000 e 2003. **(A)** Amostras reativas para o isotipo IgM; **(B)** Amostras reativas para o isotipo IgA; **(C)** Amostras reativas para o isotipo IgG.

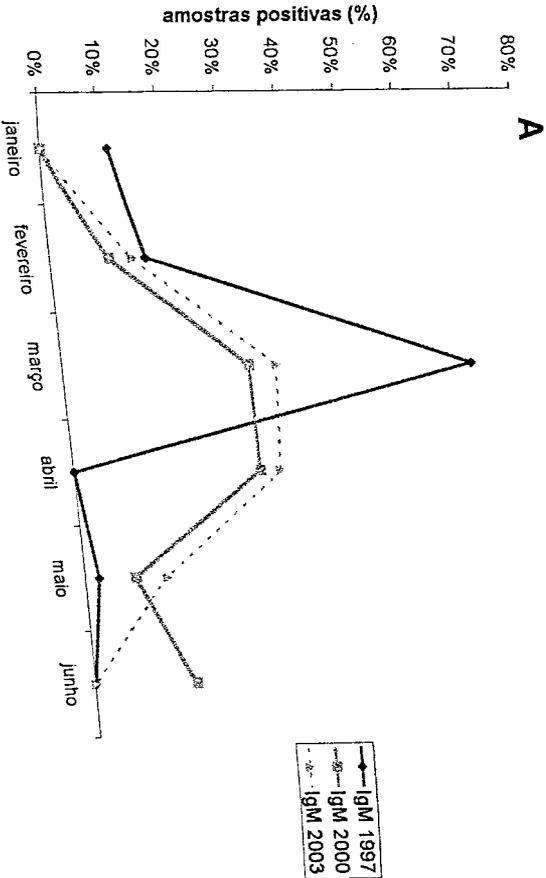


—●— IgA 1997
 —○— IgA 2000
 - - - - - IgA 2003



—●— IgG 1997
 —○— IgG 2000
 - - - - - IgG 2003

Figura 11



80%
70%
B

Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo estabeleceu uma comparação entre os níveis dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue e a reatividade desses anticorpos aos sorotipos do vírus do dengue, DEN-1, DEN-2 e DEN-3.

O ELISA de captura realizado utilizou anticorpo monoclonal direcionado à glicoproteína E do envelope viral conjugado com peroxidase para revelar as reações. Foi observado um aumento significativo na taxa de positividade para infecção pelo vírus do dengue de 1997 a 2003 na população estudada. De acordo com as informações fornecidas pelo Setor de Pesquisa e Bioestatística da Secretaria Municipal de Saúde, Uberlândia, MG (**Quadro 1, Apêndice**), esse dado indica que a incidência da doença aumentou no ano de 1997 (94,33 casos/100.000 hab) a 2000 (151,27 casos/100.000 hab) e de 2000 a 2003 (274,62 casos/100.000 hab).

De início, acreditou-se que uma mudança no Setor de Coletas poderia ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da taxa de positividade para infecção pelo vírus do dengue, no ano de 2003 em comparação com os anos de 1997 e 2000, levando em consideração a cinética da síntese de anticorpos (Setor de Pesquisa e Bioestatística da Secretaria Municipal de Saúde, Uberlândia, MG). Nos anos de 1997 a 2000, as amostras de soros dos pacientes foram colhidas a partir do 5º dia a um mês do aparecimento dos sintomas, enquanto que para o ano de 2003, a coleta dos espécimes clínicos iniciou-se a partir do 9º dia a um mês do surgimento da sintomatologia clínica.

Sabe-se que os anticorpos IgM e IgG começam a ser sintetizados a partir do 6º e do 9º dia, respectivamente, da evolução da viremia, enquanto que a produção do anticorpo IgA inicia junto com a síntese de IgM, mas em níveis bem menores, além de persistir por um curto período de tempo no sangue (TALARMIN et al., 1998; GROEN et al., 1999). De acordo com Groen et al. (1999), o anticorpo IgA só pode ser detectado até o 113º dia de infecção pelo vírus do dengue.

No entanto, de acordo com Rocco et al. (2001), a introdução de novos sorotipos do vírus do dengue em uma população susceptível é uma ameaça para a ocorrência de um aumento do número de casos positivos da doença, particularmente de suas formas severas. Portanto, o aumento da taxa de positividade para infecção pelo vírus do dengue, quando são comparados os anos de 1997 e 2000, pode ser justificado pela introdução do sorotipo viral DEN-2 no ano de 2000 (FIOCRUZ, 2002). Enquanto que o aumento do número de casos positivos entre os anos de 2000 e 2003 pode ser justificado pela introdução do sorotipo viral DEN-3 no ano de 2003 (Setor de Pesquisa e Bioestatística da Secretaria Municipal de Saúde, Uberlândia, MG).

Existem outros fatores que, em associação com a introdução de novos sorotipos virais em uma população (ROCCO et al., 2001), também levam a um aumento do número de casos positivos, como a descontinuidade dos programas de controle ao mosquito e a deteriorização dos sistemas de saúde, os quais ocorrem em muitas áreas endêmicas da doença (RIGAU-PEREZ et al., 1998; GUZMÁN; KOURI, 2002), como em muitas regiões do Brasil (TEIXEIRA et al., 1999).

Considerando que nem todas as síndromes semelhantes à febre do dengue (DF) são necessariamente devido ao vírus do dengue e que a presença de IgM dengue-específica depois de uma síndrome febril nem sempre é evidência de infecção recente, uma vez que a DF pode ter ocorrido há alguns meses, é necessário a utilização de um marcador de infecção mais recente, como por exemplo, a presença do isotipo IgA (TALARMIN et al., 1998). A presença deste isotipo pode ser um indicador que garante a ocorrência de replicação mais recente do vírus nas superfícies mucosas para muitas infecções virais (GROEN et al., 1999).

A identificação de IgG dengue-específica em pacientes com provável infecção pelo vírus do dengue também tem sido utilizada para diferenciar infecções primária e secundária (MIAGOSTOVICH et al., 1999). Amostras de soros positivas para IgM e negativas para IgG caracterizam infecção primária, enquanto que amostras negativas para IgM e positivas para IgG caracterizam infecção secundária (BRASIL, 2002b). Alternativamente, amostras de soros positivas para IgM e para IgG podem caracterizar infecção relativamente recente, primária ou secundária, dependendo do momento da coleta do sangue depois do início dos sintomas: até o 8º dia - infecção primária; depois do 15º dia - não é possível distinguir entre infecção primária e secundária (BRASIL, 2002b). Portanto, a predominância dos níveis de IgM e de IgG sobre os de IgA em 1997 e 2003, encontrados no presente estudo, sugere a ocorrência de números maiores de pacientes com infecções relativamente recentes nesses anos, as quais podem ser primária ou secundária, dependendo do momento da coleta das amostras. Além disso, a ausência de diferença estatisticamente

significante entre os níveis dos isotipos, em 2000, em associação com a maior positividade restrita encontrada para IgM e IgA, também sugerem quadros de infecção recente neste período.

No geral, MAC-ELISA, AAC-ELISA e GAC-ELISA apresentaram boa reatividade, o que reflete a presença de altos níveis desses anticorpos nas amostras e/ou uma alta sensibilidade das reações (TARDEI et al., 2000).

Quando analisando a correlação entre os três isotipos na infecção pelo vírus do dengue em todas as amostras de soros, os níveis de anticorpos detectados pelos testes ELISA de captura mostraram correlação positiva significativa em todos os períodos analisados. No entanto, quando são consideradas somente as amostras reativas, correlação positiva significativa foi encontrada somente para IgG e IgA, embora todos os isotipos foram correlacionados significativamente no ano de 2000.

O sistema complemento tem sido associado com a febre hemorrágica do dengue (DHF) e com a síndrome do choque do dengue (DSS), uma vez que sua ativação induz coagulação e, portanto, pode estar implicada na coagulação intravascular, complicação observada na DHF e no DSS. Além disso, sabe-se que a imunoglobulina mais eficiente em fixar o complemento é a IgG (KORAKA et al., 2001).

A ocorrência de doença severa também tem sido relacionada a sorotipos específicos, particularmente o DEN-3 (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2002). Apesar dos quatro sorotipos do vírus do dengue serem capazes de produzir DHF (GIBBONS, VAUGHN, 2002), DEN-2 e DEN-3 estão mais freqüentemente associados à doença severa (GUZMÁN; KOURI, 2002). Uma alta reatividade

ao epítopo E4 presente nos sorotipos DEN-3 e/ou DEN-2 nos anos estudados, os quais foram significativamente reconhecidos pela IgG, pode sugerir a presença de casos de doença severa, já que nesse período ocorreu casos de DHF.

No entanto, faz-se necessário um estudo mais detalhado desta questão, uma vez que a ocorrência de DHF está relacionada não só com os fatores de risco virais, mas também com os fatores de risco individuais e epidemiológicos (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Neste presente estudo, foi determinado a reatividade dos isotipos de anticorpos ao epítopo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos do vírus do dengue em cada período estudado, que variou desde a predominância desse epítopo em DEN-2 para todos os isotipos em 1997, passando à predominância do mesmo epítopo em DEN-2 e DEN-3 para todos os isotipos em 2000, chegando à predominância do mesmo epítopo presente no sorotipo DEN-3, também para todos os isotipos estudados, em 2003.

Já foi descrito em estudos anteriores que a presença de epítopos comuns nesses sorotipos estão mais relacionados à glicoproteína E, a única glicoproteína no envelope viral e o maior componente estrutural do vírus (ROEHRIG et al., 1983). Entre os vários anticorpos monoclonais (mAbs) isolados e caracterizados contra a glicoproteína E, o mAb denominado E4 6B6C-1, detectou epítopos dessa glicoproteína presente no vírus do dengue. Além disso, no trabalho realizado, foi o único mAb que apresentou reatividade cruzada a esses epítopos (ROEHRIG, et al., 1983).

A reatividade cruzada ocorre com muitos epítomos do vírus do dengue, assim como em outros membros da família *Flaviviridae*. Este fenômeno pode ser justificado pelo pequeno tamanho desses epítomos e pelo fato deles conterem somente um polipeptídeo, o que pode realçar a "steric hindrance" entre os anticorpos específicos para diferentes epítomos (ROEHRIG, et al., 1983).

Em estudos realizados recentemente, achados importantes mostraram a avaliação da reatividade cruzada de sete anticorpos monoclonais, inclusive o mAb E4 6B6C-1 e outros, contra quatro flavivirus de espécies de aves (BLITVICH et al., 2003). Além do mAb E4 reagir com todos os flavivirus testados, foi o único que apresentou resultados mais significantes devido a sua eficiência em detectar todos os flavivirus em questão. No entanto, contrariando toda esta informação, foi observado que não há dados até agora na literatura que avaliasse a utilização do mAb E4 6B6C-1 para determinar o padrão de distribuição dos epítomos presentes nos sorotipos do vírus do dengue. Neste presente estudo, contudo, baseado nos resultados obtidos pelo teste ELISA-univalente nas amostras estudadas em 1997, 2000 e 2003, foi demonstrado, pela primeira vez, que uma distribuição diferencial dos epítomos reconhecidos pelo mAb E4 pode estar presente entre os sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3.

Considerando a dinâmica do processo epidêmico de infecção pelo vírus do dengue nesta região do Brasil Central que começou com DEN-1, mudando para DEN-2 e DEN-3 em 1997, 2000 e 2003, respectivamente, os resultados aqui apresentados em relação à reatividade de isotipos de anticorpos ao epítomo E4 presente nos sorotipos virais, nos permite levantar a hipótese de que a expressão desse epítomo viral reconhecido pelos diferentes isotipos de

anticorpos parece ser heterogênea entre os sorotipos do vírus do dengue, sendo menos freqüente em DEN-1, quando comparado aos sorotipos DEN-2 e DEN-3 que apresentam padrões similares de expressão.

Em conclusão, a medida dos níveis dos isotipos de anticorpos na infecção pelo vírus do dengue pelo uso de GAC-ELISA e AAC-ELISA juntamente com o MAC-ELISA e a determinação de suas reatividades diferenciais ao epítipo E4 presente nos sorotipos virais, podem fornecer informações mais seguras sobre os estágios iniciais da infecção, contribuindo para o estabelecimento de uma conduta clínica mais adequada e diminuindo, dessa maneira, a probabilidade de doença fatal.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os testes MAC-ELISA, AAC-ELISA e GAC-ELISA apresentaram-se como ferramentas úteis para a detecção dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue, respectivamente, nas amostras de soros de pacientes com suspeita clínica da doença.
- Houve um aumento significativo na taxa de positividade para infecção pelo vírus do dengue de 1997 a 2003 na população estudada, que pode ser atribuído pela introdução do sorotipo viral DEN-3 no ano de 2003 e por uma mudança no Setor de Coletas.
- A predominância dos níveis de IgM e de IgG sobre os de IgA encontrados em 1997 e 2003 sugere a ocorrência de quadros de infecções relativamente recentes, as quais podem ser primária ou secundária, dependendo do momento da coleta das amostras.
- Os níveis similares dos isotipos IgM, IgA e IgG na infecção pelo vírus do dengue determinados em 2000 em associação com a maior positividade restrita de IgM e IgA neste período sugere a ocorrência de quadros de infecção recente.

- Considerando somente as amostras reativas, uma correlação positiva significativa foi encontrada apenas para os isotipos IgG e IgA, embora todos os isotipos foram correlacionados significativamente no ano de 2000.
- Uma alta reatividade ao epítipo E4 6B6C-1 presente nos sorotipos DEN-3 e/ou DEN-2, o qual foi reconhecido significativamente pelo isotipo IgG, pode indicar a presença de casos de doença severa.
- A determinação simultânea dos níveis dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue pelo uso de GAC-ELISA e AAC-ELISA juntamente com o MAC-ELISA podem permitir um diagnóstico mais seguro e confiável quanto aos diferentes estágios da infecção.
- A avaliação das reatividades diferenciais dos isotipos na infecção pelo vírus do dengue aos sorotipos virais podem fornecer informações úteis sobre os sorotipos virais predominantes na população estudada, contribuindo para o estabelecimento de uma conduta clínica mais adequada e diminuindo a probabilidade de doença fatal.

Apêndice

Quadro 1. Incidência dos prováveis casos de dengue, ocorridos em Uberlândia, MG, nos anos de 1993 a 2003.

<u>Ano</u>	<u>Incidência (100.000 hab)</u>
1993	635,29
1994	69,23
1995	519,69
1996	334,63
1997	94,33
1998	64,23
1999	1206,61
2000	151,27
2001	393,48
2002	693,84
2003	274,62

Fonte: Setor de Pesquisa e Bioestatística, Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde, Uberlândia, MG.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. In:_____. **Imunologia celular e molecular**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda , 2002a. p. 235-269.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Mecanismos Efetores da Imunidade Humoral. In:_____. **Imunologia celular e molecular**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2002b. p. 309-334.

ANDERSON, R.; WANG, S.; OSIOWY, C.; ISSEKUTZ, A. C. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4226-4232, 1997.

BALMASEDA, A.; GUZMÁN, M. G.; HAMMOND, S.; ROBLETO, G.; FLORES, C.; TÉLLEZ, Y.; VIDEA, E.; SABORIO, S.; PÉREZ, L.; SANDOVAL, E.; RODRIGUEZ, Y.; HARRIS, E. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 317-322, 2003.

BELO HORIZONTE. Sistema único de Saúde de Belo Horizonte e Prefeitura de Belo Horizonte. **Informe clínico epidemiológico**. Disponível em :
<<http://www.medicina.ufmg.br/spt/dengue/infotec.htm>>. Acesso em: 05 set. 2000.

BLITVICH, B. J.; MARLENEE, N. L.; HALL, R. A.; CALISHER, C. H.; BOWEN, R. A.; ROEHRIG, J. T.; KOMAR, N.; LANGEVIN, S. A.; BEATY, B. J. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1041-1047, 2003.

BRANCH, S. L.; LEVETT, P. N. Evaluation of four methods for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 4, p. 555-557, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de dengue – vigilância epidemiológica e atenção ao doente**. 2ª ed. Brasília: DEOPE, 1996. p. 07-77.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica, 2001**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 3 jan. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue. Diagnóstico e Manejo Clínico**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2002a. p. 05-25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: roteiro para capacitação de profissionais médicos no diagnóstico e tratamento**

de dengue. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, 2002b. p. 04-37.

CAMPBELL-LENDRUM, D.; REITHINGER, R. Dengue and climate change. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 524, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC dengue fever home page - CDC Division of Vector-Borne Diseases. Disponível em: < <http://www.cdc.gov> > . Acesso em: 3 jan. 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC dengue fever home page - CDC Division of Vector-Borne Diseases. Dengue: Clinical and Public Health Aspects. Disponível em: < <http://www.cdc.gov> > . Acesso em 19 jan. 2004.

CHANG, H.-H.; SHYU, H.-F.; WANG, Y.-M.; SUN, D.-S.; SHYU, R. I.; TANG, S.-S.; HUANG, Y.-S. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1):? Arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 743-756, 2002.

CHATURVEDI, U. C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E. A.; MUSTAFA, A. S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS, Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 183-188, 2000.

De PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. da. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 102, p. 113-117, 2002.

DA SILVA, M. A. N.; CALADO, D. C.; TISSOT, A. C.; CHRESTANI, M. Biologia de imaturos e adultos de *Aedes albopictus* sob condições de laboratório e ecologia de *Culicidae* em área de mata de Curitiba, PR. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 10 (Supl. 1), p. 17-19, 2001.

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

DOS SANTOS, C. N. D.; ROCHA, C. F. S.; CORDEIRO, M.; FRAGOSO, S. P.; REY, F.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Research**, v. 90, p. 197-205, 2002.

FALCONAR, A. K. I. & YOUNG, P. R. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. **Journal of Virological Methods**, v. 30, p. 323-332, 1990.

FEIGHNY, R.; BURROUS, J.; PUTNAK, R. Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 322-328, 1994.

FERREIRA, P. P. O vírus da dengue. Disponível em:

< www.fiocruz.br/ccs/glossário/dengue_virus.htm >. Acesso em: 20 jan. 2004.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. p. 201-214.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP). A dengue. **Súmula**, v.87, p.1-16, 2002.

GIBBONS, R. V. & VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**, v. 321, p. 1563-1566, 2002.

GROEN, J.; VELZINGA, J.; COPRAA, C.; BALENTIENB, E.; DEUBELC, V.; VORNDAMD, V.; OSTERHAUSA, A. D. M. E. Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 13, p. 1085-1090, 1999.

GROEN, J.; KORAKA, P.; VELZING, J.; COPRA, C.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific

immunoglobulin M and G antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 6, p.867-871, 2000.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G.; BRAJO, J. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas: re-emergencia del dengue. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 51, p. 5-13, 1999.

GUZMÁN, M. G. & KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 33-42, 2002.

HALL, R. A.; KAY, B. H.; BURGESS, G. W.; CLANCY, P.; FANNING, I. D. Epitope analysis of the envelope and non-structural glycoproteins of Murray Valley encephalitis virus. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 2923-2930, 1990.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI Hypothesis and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, p. 350-362, 1970.

HEINZ, E. X. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. **Advance Virus Research**, v. 31, n. 3, p. 103-168, 1986.

HUNG, S.-L.; LEE, P.-L.; CHEN, H.-W.; CHEN, L.-K.; KAO, C.-L.; KING, C.-C. Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. **Virology**, v. 257, p. 156-167, 1999.

KONISHI, E. & FUJII, A. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. **Vaccine**, v. 20, p. 1058-1067, 2002.

KORAKA, P.; SUHARTI, C.; SETIATI, T. E.; MAIRUHU, A. T. A.; VAN GORP, E.; HACK, C. E.; JUFFRIE, M.; SUTARYO, J.; VAN DER MEER, G. M.; GROEN, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4332-4338, 2001.

KORAKA, P.; ZELLER, H.; NIEDRIG, M.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; GROEN, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1209-1215, 2002.

KOURI, G. P.; GUZMÁN, M. G.; BRAVO, J. R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba?: an integral analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 821-823, 1987.

KUNO, G.; VORNDAM, A. V.; GUBLER, D. J.; GÓMEZ, I. Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot. **Journal of Medical Virology**, v. 32, p. 102-108, 1990.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 545-551, 1992.

LEBLOIS, H. & YOUNG, P. R. Maturation of the dengue-2 virus NS1 protein in insect cells: effects of downstream NS2A sequences on baculovirus-expressed gene constructs. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 979-984, 1995.

LOURENÇO-de-OLIVEIRA, R.; HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; SCHATZMAVR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; ALVES, J. C. R.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue Virus Type E Isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 799-800, 2002.

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**, v. 173, p. 291-3-1, 1989.

MARKOFF, L. In vitro processing of dengue virus structural proteins: cleavage of the pre-membrane protein. **Journal of Virology**, v. 63, n. 8, p. 3345-3352, 1989.

MENDES, Juliano Sousa. **Determinação de Frações Proteicas dos Sorotipos DEN-1 e DEN-2 do Vírus do Dengue pelo Teste Western-Blotting**. 2000. 74f. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG.

MIAGOSTOVICH, M. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; dos SANTOS, F. B.; SCHATZMAYR, H. G.; ARAÚJO, E. S. M.; VORNDAM, V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology**, v. 14, p. 183-189, 1999.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. **Protocolo de febres hemorrágicas**. Belo Horizonte: Assessoria de Comunicação Social – SES/MG, 2002. p. 05-93.

MOSMANN, T. R. & SAD, S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.

PINHEIRO, F. P.; da ROSA, J. F. S. T. Febres Hemorrágicas Viróticas (Dengue, Ébola, Sabiá, Marburg, Hantaan e Outros). In: VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. p. 258-273.

PIMENTA, F. G. & DA SILVA, H. S. B. Noções básicas sobre o dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 10 (Suplem. 1), p. 7, 2001.

PRYOR, M. J. & WRIGHT, P.J. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1183-1187, 1994.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.; VORNDAM, A. V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, p. 971-977, 1998.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.

ROEHRIG, J. T.; MATHEWS, J. H.; TRENT, D. W. Identification of epitopes on the glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies. **Virology**, v. 128, p. 118-126, 1983.

ROTHMAN, A. L. & ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. **Virology**, v. 257, p. 1-6, 1999.

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

SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 181-195, 2002.

SMITH, G. W.; WHIGHT, P. J. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 559-571, 1985.

SPAUDING, A. C.; KURANE, I.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Analysis of murine CD8+ T-cell clones specific for the dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 398-403, 1999.

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

TARDEI, G.; RUTA, S.; CHITU, V.; ROSSI, C.; TSAI, T. F.; CERNESCU, C. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2232-2239, 2000.

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

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M. C. N.; FERREIRA, L. D. A.; VASCONCELOS, P. Dinâmica da circulação do vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 2, p. 87-97, 2003.

WANG, S.; HE, R.; ANDERSON, R. PrM and cell-binding domains of the dengue virus E protein. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3, p. 2547-2551, 1999.

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

VÁZQUEZ, S.; GUZMÁN, M. G.; GUILLEN, G.; CHINEA, G.; PÉREZ, A. B.; PUPO, M.; RODRIGUEZ, R.; REYES, O.; GARAY, H. E.; DELGADO, I.; GARCÍA, G.; ALVAREZ, M. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, v. 20, p. 1823-1830, 2002.