



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Plínio Luís Luppino

Detecção do Vírus Dengue pela Técnica de
Aglutinação do Látex em Modelo Experimental

São José do Rio Preto
2007

Plínio Luís Luppino

Detecção do Vírus Dengue pela Técnica de
Aglutinação do Látex em Modelo Experimental

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Doutor no Curso
de Pós-graduação em Ciências da
Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Édimo Garcia de Lima

São José do Rio Preto
2007

Luppino, Plínio Luís

Detecção do Vírus Dengue pela Técnica de Aglutinação do
Látex em Modelo Experimental / Plínio Luís Luppino

São José do Rio Preto, 2007

69 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do
Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Édimo Garcia de Lima

1. Vírus dengue; 2. Diagnóstico precoce; 3. Aglutinação do
látex.

Plínio Luís Luppino

Detecção do Vírus Dengue pela Técnica de
Aglutinação do Látex em Modelo Experimental

Banca Examinadora

Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Presidente e Orientador: **Édimo Garcia de Lima**

2º Examinador: **Irineu Luiz Maia**

3º Examinador: **Rubens Rocha Vieira**

4º Examinador: **Patrícia Maluf Cury**

5º Examinador: **Edison Luiz Durigon**

Suplente: **João Aris Kouyoumdjian**

São José do Rio Preto, 04/06/2007

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	ii
Agradecimentos	iii
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabela.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução	01
1.1. Problema de Saúde Pública Mundial – Aspectos Históricos	02
1.2. Vírus Dengue	07
1.3. Fatores de Risco, Prevalência e Disseminação	09
1.4. Patogênese de DHF/DSS	12
1.5. Diagnóstico	14
1.5.1. Diagnóstico Clínico	14
1.5.2. Viremia	15
1.5.3. Diagnóstico Laboratorial	17
1.5.4. Isolamento e Identificação do Vírus Dengue	17
1.5.5. Diagnóstico Sorológico.....	20
1.5.6. Aglutinação do Látex	22
1.6. Objetivos	24
2. Material e Método	25

2.1. Amostra Viral: Obtenção do Antígeno	26
2.2. Flúido Ascítico: Obtenção de Anticorpos	27
2.3. Aglutinação do Látex.....	30
2.4. Cálculo da Dose Letal – DL 50.....	30
2.5. Reativos e Soluções.....	31
3. Resultados e Discussão	34
4. Conclusões	53
5. Referências Bibliográficas.....	55

Dedico este trabalho

- ✓ À minha esposa Renata, às minhas filhas: Alice, Emilia e Julia, pela compreensão e participação nas etapas deste projeto.

- ✓ Aos meus pais: Paschoal e Nilza pelo eterno entusiasmo e estímulo ao sucesso.

Agradecimentos Especiais

- ✓ Agradeço ao Prof. Dr. Édimo Garcia de Lima pela esmerada e dedicada orientação, que ultrapassou os limites deste trabalho, abrangendo a sua vivência acadêmica, científica e pessoal.

- ✓ Agradeço de forma muito especial ao Prof. Dr. Luís Tadeu Moraes Figueiredo, pela disponibilidade em sugerir, criticar, ensinar as bases da virologia, e de disponibilizar integralmente o seu laboratório e materiais para execução deste projeto.

Agradecimentos

- ✓ À Dra. Soraia Jabur Badra, biomédica da Unidade Multidisciplinar de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo cuidado e empenho em realizar a contento as tarefas do projeto.
- ✓ À Prof. Dra. Eny Maria Goloni Bortollo, por ceder o Laboratório de Biologia Molecular para realização de medições.
- ✓ Ao Prof. Carlos Cavazini, que cedeu as instalações do laboratório de Parasitologia Molecular, onde grande parte dos experimentos foi executada.
- ✓ A todos os funcionários do Biotério da FAMERP pela inestimável ajuda.
- ✓ A todos os professores do Curso de Pós Graduação da FAMERP.
- ✓ À Profa. Dra. Antonia Maria de Oliveira Machado pela inestimável ajuda na redação deste texto.
- ✓ À diretoria do Laboratório Laborclin de Curitiba – PR, que acreditou no projeto e doou material vital à execução.
- ✓ À Sra. Rose Desidério pela correta formatação deste texto.

- ✓ A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta tese.

- ✓ A Deus.

Muito Obrigado!

Lista de Figuras

Figura 1.	Imunofluorescência indireta positiva em células clone C6/36 infectadas com DEN-1 <i>Moshizuki</i>	45
Figura 2.	Imunofluorescência indireta positiva em células clone C6/36 infectadas com DEN-1 <i>Moshizuki</i>	45
Figura 3.	Imunofluorescência indireta em células clone C6/36, não infectadas.....	46
Figura 4.	Imunofluorescência indireta em células clone C6/36, não infectadas.....	46
Figura 5.	Células de sarcoma 180/TG, coloração giemsa.....	47
Figura 6.	Células de sarcoma 180/TG, coloração giemsa.....	47
Figura 7.	Camundonga ascíte volumosa desenvolvido após 8 dias de inoculação intraperitoneal de 200µL de suspensão de células de sarcoma 180/TG.....	48
Figura 8.	Camundongas com ascíte desenvolvida após 8 dias de inoculação intraperitoneal de 200µl de suspensão de células de sarcoma 180/TG.....	48
Figura 9.	Imunofluorescência indireta em células clone C6/36 infectados com DEN-1 <i>Moshizui</i>	49
Figura 10.	Imunofluorescência indireta em células clone C636, infectados com DEN-L	49
Figura 11.	Partículas de látex em suspensão com distribuição homogênea, pronta para uso.....	50

Figura 12. Borda da gota (40 μ L) de suspensão de partícula de látex pronta para uso.....	50
Figura 13. Reação de aglutinação do látex positiva com grandes aglutinados.....	51
Figura 14. Reação de aglutinação do látex positiva com grandes aglutinados.....	51
Figura 15. Reação de aglutinação do látex positiva.....	52
Figura 16. Reação com discreta aglutinação do látex, borda da gota de suspensão com pequenos aglutinados apenas na periferia.....	52

Lista de Tabela

Tabela 1. Diluição do inóculo e mortalidade.....	41
--	----

Resumo

A dengue é a doença viral, transmitida por artrópode, de maior prevalência mundial em morbidade e mortalidade. Alcança proporções pandêmicas, estimando-se em 1,6 milhões de doentes anualmente. Manifestações clínicas características, associadas a fatores epidemiológicos, como prevalência da dengue na região de origem do paciente, têm sido os únicos instrumentos de diagnóstico precoce. O diagnóstico laboratorial, que é definitivo, demanda vários dias, quando realizado o isolamento viral. Métodos sorológicos dependem de níveis elevados de anticorpos específicos e os métodos moleculares não estão disponíveis para a maioria dos laboratórios de diagnóstico e rotina. Este estudo teve como objetivo desenvolver método de aglutinação do látex para a detecção do vírus dengue, utilizando amostras biológicas de camundongos infectados por via intracerebral com dengue 1, cepa *Mochizuki* e anticorpos específicos anti-dengue 1, obtidos de camundongos imunizados. Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade deste método para diagnóstico do vírus Dengue em amostras positivas de animais de experimentação, abrindo novas perspectivas para o diagnóstico precoce da dengue na população susceptível, durante os primeiros dias de sintomas.

Palavras-Chave: 1.vírus dengue; 2. diagnóstico precoce; 3. aglutinação do látex.

Abstract

Dengue is the arthropod-borne transmitted viral disease of highest worldwide prevalence in mortality and morbidity. The proportion is pandemic ranging 1.6 million of infected patients yearly. Clinical presentation associated to epidemiological factors such as dengue prevalence in the patient's origin have been the only mean for early diagnosis. Laboratorial diagnosis, the conclusive, requires several days when there is viral isolation. Serological methods depend on high level of specific antibodies, and molecular methods are not available for the majority of laboratories of diagnosis and routine. The purpose of this study was to develop an agglutination method using latex to detect dengue virus, using biological samples of mice infected with dengue 1 *Mochizuki* strain by intracerebral via, and anti-dengue 1 specific antibodies from immunized mice. According to the results, this method was feasible for the dengue viruses diagnosis in positive samples of experimental animals. It provides further approaches for rapid detection of dengue in susceptible populations during the first days of the disease.

Key-Words: 1. dengue viruses; 2. early diagnosis; 3. latex agglutination.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A “Enciclopédia Chinesa de Sintomas e Remédios das Doenças”,⁽¹⁾ publicada inicialmente durante a Dinastia Chin entre 265 e 420 d.C. e reeditada por outras duas Dinastias: Tang e Sung, descrevia doença denominada “Febre da Água”, associada a insetos voadores e água. Desde então, relatos de doença semelhante à dengue na Índia em 1635, no Panamá em 1699 e de grandes epidemias no período compreendido entre 1779 e 1980, ocorridas na Ásia, África e América do Norte,^(2,3) revelam a periodicidade de ocorrência e a vasta área de distribuição mundial da dengue ou doença semelhante.

1.1. Problema de Saúde Pública Mundial – Aspectos Históricos

Durante a Segunda Grande Guerra, a destruição de grandes áreas florestais no sudeste da Ásia facilitou o aumento da transmissão de doenças transmitidas por mosquitos. Considera-se esta a origem da pandemia mundial de dengue. Secundariamente, a elevação da ocorrência de doenças transmitidas por mosquitos, o aumento da área de distribuição dos mesmos e a cocirculação de vários sorotípos do vírus dengue nas cidades do sudeste asiático, provocaram a emergência de uma nova doença: a Febre Hemorrágica da Dengue (DHF) e Síndrome do Choque por Dengue (DSS).^(4,5)

A primeira epidemia descrita de DHF, ocorrida nas Filipinas (Manila), entre 1953 e 1954, manteve-se durante 20 anos, portanto até a metade dos anos 70, como a maior causa de hospitalização e morte de crianças em todo o

sudeste asiático,⁽⁶⁾ expandindo-se para a Índia, Sri Lanka, Paquistão, China⁽⁷⁾ e posteriormente para ilhas do Pacífico sul e central: Palau, Yap, Tahiti, Nova Caledonia e Vanatu.⁽⁸⁾

Desde 1827, têm sido descritas múltiplas epidemias de dengue na América continental e Caribe. Inicialmente baseadas em características clínicas,⁽⁹⁾ e posteriormente, à medida que se dispôs de técnicas de diagnóstico virológico e sorológico, confirmaram-se os diagnósticos clínicos prévios em estudos retrospectivos,^(10,11) identificando-se os quatro sorotipos do dengue em períodos e países distintos. Durante os anos cinqüenta, sessenta, e parte da década de setenta, o diagnóstico de febre dengue era raro, devido à erradicação do principal vetor de transmissão do vírus dengue, o mosquito *Aedes aegypti*,⁽¹²⁾ porém, a suspensão, a partir de meados dos anos 70, dos programas de erradicação do vetor de transmissão e dos programas de manutenção das metas alcançadas, possibilitou a reintrodução do mosquito em países livres da doença, resultando em distribuição geográfica, durante a década de 90, equivalente à distribuição que antecedeu os programas de erradicação.

As epidemias de dengue ocorreram secundariamente à reinfestação do mosquito *Aedes aegypti*. Durante a década de oitenta, foram descritas grandes epidemias de dengue em países que durante 35 a 130 anos estiveram livres da doença.

Desta forma, países que apresentavam a doença na forma não endêmica ou “hipoendêmica” (apenas um sorotipo identificado), evoluíram para

“hiperendemicidade” (vários sorotipos presentes), emergindo a DHF/DSS, da mesma forma que no sudeste asiático 25 anos antes.⁽¹³⁾

Até 1997, os sorotipos DEN-2 e DEN-3 eram predominantes nas Américas e neste ano, o sorotipo DEN-1 foi detectado, causando epidemias na Jamaica, Cuba, Porto Rico e Venezuela. Em 1981, uma nova cepa do sorotipo DEN-2, proveniente da Ásia, foi introduzida em Cuba, causando a primeira epidemia de DHF nas Américas, com 158 mortos. O sorotipo DEN-3, que circulou até meados da década de 70, foi reintroduzido em 1994, causando uma grande epidemia na Nicarágua, que depois se disseminou para o México e outros países da América Central e do Sul. Em 1981, o sorotipo DEN-4 foi isolado nas ilhas do Caribe.⁽¹⁴⁾

Durante o período de 1981 a 1997, 24 países do continente americano confirmaram laboratorialmente o diagnóstico de dengue e DHF/DSS.

Atualmente, o vírus dengue e o mosquito *Aedes aegypti* distribuem-se amplamente na região tropical, afetando 100 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas, 2,5 milhões de indivíduos adoecem por dengue todos os anos e muitas centenas de milhares evoluem para DHF/DSS.^(15,16)

A primeira descrição de surto de dengue no Brasil, com casos confirmados laboratorialmente, ocorreu na cidade de Boa Vista, Roraima, em 1982. Estima-se que sete mil pessoas foram infectadas, sendo treze amostras de sangue confirmadas positivas para o sorotipo DEN-1 e quatro para o sorotipo DEN-4.⁽¹⁷⁾

Entre as décadas de 50 e 70, o risco de ocorrência da doença no Brasil foi minimizado com a erradicação do vetor após intensa vigilância

epidemiológica. Em 1976, foi novamente detectado nos Estados da Bahia e Rio de Janeiro⁽¹⁸⁾ e durante a década de 80 em diversas cidades do Brasil, dispersando-se para grande parte do País através do transporte rodoviário.

Durante a década de 90, a incidência da dengue elevou-se em consequência da disseminação do *A aegypti* no País, especialmente a partir de 1994. A dispersão do vetor foi seguida pela disseminação dos sorotipos DEN-1 e DEN-2 em vinte e sete Estados da Federação.⁽¹⁹⁾ Sendo notificados: 97.000 casos de dengue, 188 de DHF em 1991; 125.000 casos de dengue, 105 de DHF, dois óbitos em 1995; 175.000 casos de dengue, 2 de DHF em 1996; 230.000 casos de dengue, com isolamento e identificação dos sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3, 59 de DHF, 3 óbitos em 2000; 413.000 casos de dengue, 679 de DHF, 29 óbitos, em 2001; 780.000 casos de dengue, 2.607 de DHF, 145 óbitos em 2002; 324.000 casos de dengue, 618 de DHF, 33 óbitos em 2003.⁽²⁰⁾

Em 2003, os sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 foram isolados em 23 Estados da Federação, com número elevado de internações por DHF.⁽²¹⁾

Em 2005 (até a semana epidemiológica 24), foram registrados 107.575 casos notificados, destes, 72 casos de DHF e 5 óbitos. Quando comparados aos dados do mesmo período de 2004 (79.674) observa-se aumento de 29,9% no número de notificações. Oito Estados da Federação apresentaram redução no total de casos notificados e dezenove apresentaram aumento. A circulação autóctone dos sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 foi verificada em 24 Estados, permanecendo sem circulação autóctone apenas os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no Estado de Rondônia foi identificada a circulação dos

sorotipos DEN-1 e DEN-3. No mesmo período, foram realizadas 15.360 internações por dengue e DHF no país.⁽²²⁾

No Estado de São Paulo, em 2005 (até a semana epidemiológica 32), foram notificados 4.665 casos autóctones, cerca de 50% acima do registrado no mesmo período de 2004 (3060 casos); em relação à distribuição, observou-se que o número de municípios com transmissão (cento e três) dobrou em comparação ao ano anterior (quarenta e sete), no mesmo período.⁽²³⁾

A vigilância epidemiológica da dengue deve ter agilidade suficiente para detectar precocemente a ocorrência de epidemias e casos de evolução grave, reduzindo a letalidade. Nos serviços de vigilância, a notificação espontânea ambulatorial e hospitalar dos casos clínicos suspeitos de dengue, pode gerar informações com representatividade distorcida, por ser método passivo de coleta de dados, especialmente em períodos interepidêmicos.⁽²¹⁾ A qualidade dos dados pode ser avaliada por meio da medida do sub-registro de casos, que é decorrente de diversos fatores. Entre eles, citam-se subnotificações, problemas no processamento dos dados, na transferência de informações, desestímulo e descontinuidade do processo de notificação por parte dos profissionais de saúde. Avaliação da qualidade dos dados do sistema de vigilância epidemiológica na detecção de casos suspeitos de dengue internados em hospitais públicos e conveniados do Sistema Único de Saúde, verificou sub-registro de 37% dos casos no período de 1997 a 2002, associados aos casos internados sem manifestações hemorrágicas e sem exames laboratoriais específicos para dengue no prontuário. A sensibilidade do

Sistema de Notificação foi de 63% e o valor preditivo positivo foi de 43%, resultando na falsa elevação da taxa de letalidade da doença.⁽²¹⁾

1.2. Vírus Dengue

No Brasil, entre as arboviroses, aquelas transmitidas por mosquitos infectados por *Flavivirus* são as grandes causadoras de surtos e epidemias.^(18,24,25) *Arbovirus* são vírus que se perpetuam na natureza principalmente pela propagação biológica entre vertebrados hospedeiros susceptíveis e artrópodes hematófagos, ou pela transmissão transovariana ou venérea do artrópode, desta forma identificados como: *arthropod borne viruses* – vírus transmitido por artrópode, conforme definição da *WHO – World Health Organization*.

Entre os mais de 500 *arbovirus* conhecidos e distribuídos mundialmente, segundo suas características epidemiológicas e antigênicas,⁽²⁶⁻²⁸⁾ por volta de 200 são bem conhecidos. Entre eles alguns são agentes patogênicos importantes para o homem, como o vírus dengue.

O Brasil e particularmente a região amazônica, é recordista mundial em isolamento de *Arbovirus*.^(29,30)

Dentre as seis Famílias de *Arbovirus*, a Família *Flaviviridae* contém atualmente três Gêneros: *Flavivirus* (o primeiro), *Pestivirus*,⁽³¹⁾ e *Hepacivirus* (vírus da hepatite C).⁽³²⁾ Sendo que foram isolados ao menos 68 vírus,⁽³³⁾ dos quais, mais de trinta com importância médica.⁽³⁴⁾ A erradicação dos *Flavivirus* é improvável, por sua manutenção em animais reservatório e por serem

transmitidos transovariana e venereamente por artrópodes.⁽³⁵⁾ Portanto medidas de prevenção e profilaxia como campanhas maciças de imunização e/ou redução do vetor, pela educação pública e eliminação ou controle do inseto, devem ser promovidas de forma permanente.

Secundariamente o Gênero *Flavivirus* da Família *Flaviviridae* foi dividido em sete complexos sorológicos diferentes; o uso de anticorpos monoclonais e testes de neutralização possibilitaram conhecimento mais profundo da estrutura antigênica de cada um deles.^(36,37)

O vírus dengue, pela primeira vez isolado de camundongos em 1945, é esférico, possui envelope, mede 40 – 60 nanômetros de diâmetro. O genoma é constituído por fita simples de RNA de polaridade positiva, de aproximadamente 11.000 nucleotídeos. Possui três proteínas estruturais: proteína C, localizada no nucleocapsídeo ou proteína do núcleo; proteína M, associada à membrana; proteína E do envelope, que é a principal proteína estrutural.⁽³⁸⁾

O genoma é envolvido por membrana lipídica, que é recoberta pela proteína do envelope (proteína E). As principais propriedades biológicas do vírus dengue estão relacionadas à proteína E, que recobre totalmente a membrana e o genoma. A proteína E possibilita a ligação dos vírus aos receptores celulares, tem tropismo celular e a capacidade de aglutinar eritrócitos. Há alguma variação na composição da proteína E, entre os sorotipos do dengue, inclusive nos epítomos, que constituem antígenos de superfície e determinam a resposta imunológica e a proteção contra o vírus e desta forma a classificação dos sorotipos.⁽³⁹⁾

São quatro os sorotipos:⁽⁴⁰⁾ DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, diferenciados por provas bioquímicas, sorológicas e por técnicas moleculares de amplificação do genoma viral,⁽⁴¹⁻⁴³⁾ que têm evidenciado a existência de genótipos distintos pertencentes ao mesmo sorotipo.⁽⁴⁴⁾

As proteínas estruturais M e C e duas proteínas não estruturais NS1 e NS3, de um total de sete: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, são também capazes de induzir resposta imunológica protetora em modelos animais, porém ainda não se conhece com precisão o seu papel.⁽⁴⁵⁾

A replicação do vírus dengue ocorre preferencialmente nos macrófagos. Após a infecção por um determinado sorotipo, ocorre estímulo da imunidade humoral e celular. A produção de anticorpos é homóloga, com pouca ou nenhuma produção de anticorpos neutralizantes contra outros sorotipos. Altos títulos de anticorpos contra vírus dengue, adquiridos por via transplacentária, protegem os recém-nascidos nos primeiros meses de vida, como é observado nas regiões endêmicas. A proteção homóloga após infecção primária por um sorotipo é duradoura; entretanto, a taxa de proteção cruzada contra outros sorotipos é ausente ou de curta duração.⁽⁴⁶⁾

É transmitido pelo mosquito *Aedes ssp*, especialmente *Aedes aegypti* e secundariamente pelo *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*.^(42,43)

1.3. Fatores de Risco, Prevalência e Disseminação

Os fatores que tornaram a prevalência da dengue nos últimos 20 anos um problema de saúde pública mundial não estão completamente elucidados. A

disseminação dos diversos sorotipos em muitas regiões do mundo está intimamente ligada a grandes mudanças demográficas e sociais nos últimos 50 anos. O crescimento desmedido da população mundial, associado à urbanização descontrolada e sem planejamento, especialmente nos países em desenvolvimento, a conseqüente degradação da qualidade das habitações, superpopulação urbana, deterioração da qualidade da água, deficiência dos programas de controle do mosquito, dos programas de saúde pública e problemas de ordem econômico-social de países em desenvolvimento, criaram as condições ideais para o aumento da ocorrência das doenças transmitidas por mosquitos, principalmente nos centros urbanos tropicais.

A ênfase dos programas e controle da dengue tem sido, nos últimos 25 anos, a pulverização de inseticidas para matar mosquitos adultos. Sem apresentar a eficácia esperada,⁽⁴⁷⁾ estes programas criaram tanto para a população quanto para as autoridades sanitárias a “falsa impressão de segurança”. Adicionalmente, a distribuição geográfica e a densidade populacional do mosquito *Aedes aegypti* aumentaram, especialmente nas áreas urbanas dos países tropicais, devido ao aumento de locais propícios para sua proliferação, como recipientes de plástico e borracha não biodegradáveis, distribuídos nas periferias urbanas e no ambiente doméstico, além do hábito do cultivo de plantas ornamentais no mesmo ambiente. O importante incremento das viagens aéreas, nos últimos vinte anos, é outro fator responsável pelo crescimento da prevalência da dengue no mundo, já que é o mecanismo ideal de transporte do dengue e outros patógenos entre os diferentes centros populacionais do mundo.⁽⁴⁸⁾ Durante o ano de 1994, 40 milhões de pessoas

partiram dos Estados Unidos em viagens aéreas; destes, a metade viajou a negócios ou turismo, para países tropicais onde a dengue é endêmica. Muitos viajantes infectaram-se com o vírus dengue durante estas visitas e adoeceram apenas após o retorno, resultando no contínuo transporte do vírus por pessoas infectadas para todas as regiões do planeta e introduzindo repetidamente sorotipos diferentes nas regiões onde o mosquito *Aedes ssp* está presente.⁽⁴⁹⁾

O último fator que tem contribuído para o ressurgimento da epidemia de dengue é a falta de recursos financeiros direcionados ao treinamento e reciclagem de técnicos, médicos e paramédicos. A carência de especialistas preparados para desenvolver programas efetivos de prevenção e controle de doenças transmitidas por mosquitos tem motivado mudanças na política de saúde pública dos países endêmicos, dando ênfase às medidas emergenciais como aquisição de tecnologia de alto custo, para controle do mosquito adulto, em detrimento aos programas de conscientização e adequação do ambiente doméstico com melhoria das condições de higiene da população susceptível.⁽⁵⁰⁾

Grandes mudanças demográficas e sociais, aliadas à carência de programas de prevenção e controle efetivos, colocaram a febre por dengue como a doença viral, transmitida por artrópode, mundialmente mais importante em morbidade e mortalidade,^(51,52) com distribuição que alcança proporções pandêmicas, estimando-se em 1,6 milhões de doentes distribuídos por 61 países.⁽⁵³⁾

1.4. Patogênese de DHF/DSS

A patogênese de DHF/DSS ainda é controversa. Duas teorias, que não são excludentes entre si, são freqüentemente citadas para explicar a origem das alterações patogênicas que ocorrem em DHF e DSS. Assim, indivíduos infectados com um sorotipo do dengue têm imunidade apenas para este e são susceptíveis as infecções por sorotipos heterólogos, após um curto período de proteção cruzada.⁽⁵⁴⁾ Desta forma, anticorpos pré-existentes reconhecem o segundo vírus infectante, forma-se o complexo antígeno - anticorpo que é fixado à membrana dos leucócitos e fagocitado, especialmente por macrófagos. Porém, o complexo antígeno - anticorpo formado é instável quando o segundo vírus infectante é de sorotipo diferente do primeiro, não sendo neutralizado e portanto livre para se replicar, por estar no interior do macrófago. Outra teoria leva em conta a possibilidade de mutações genéticas no vírus dengue, que surgiriam pressionadas pela repetição do ciclo que os mantém na natureza. Em regiões endêmicas, ocorreriam mutações causadas pela ocorrência de infecções simultâneas por dois vírus diferentes, que possibilitariam o aparecimento de um terceiro sorotipo.^(55,56) Não há descrição da ocorrência de DHF/DSS na vigência da terceira ou quarta infecção por dengue.⁽⁵⁴⁾

Sugere-se outra razão pela qual anticorpos pré-existentes (da primeira infecção) não sejam eficientes na neutralização do vírus dengue, na ocorrência da segunda infecção por outro sorotipo: vários epítomos do segundo sorotipo difeririam do primeiro reduzindo a especificidade e afinidade dos anticorpos.⁽⁵⁷⁾ O intervalo de tempo entre a primeira e segunda infecção poderia ser de

poucos meses a vinte anos ou mais.⁽⁵⁸⁾ Como outros vírus que infectam animais, o vírus dengue apresentaria variações genéticas que causariam alterações em sua capacidade de replicação e infectividade e desta forma, na severidade da doença e potencial epidêmico. A permeabilidade vascular aumentada e hemorragia severa teriam origem a partir das células alvo da infecção por dengue: os leucócitos mononucleares e portanto, concentrações subneutralizantes de anticorpos anti-dengue aumentariam a infectividade do segundo sorotipo, definida como imunidade aumentada – “enhancement”.⁽³⁷⁾

O limite entre a imunidade para o vírus dengue e a ocorrência de casos graves determinada por ação imunológica, é impreciso. Como exemplo, pode ser observado o que ocorreu no Peru, onde durante décadas predominou o sorotipo DEN-1. Em 1995, foi introduzido o sorotipo DEN-2 responsável por mais de 50.000 infecções secundárias, porém, não foram notificados casos de DHF. Ao contrário do ocorrido em outros países, as infecções secundárias não determinaram o surgimento de casos graves. O genótipo do sorotipo DEN-2 que circulou foi posteriormente identificado como Americano (American DEN-2) e apresentava algumas diferenças nos aminoácidos das proteínas antigênicas da membrana e do envelope, em comparação com o genótipo DEN-2 Asiático.⁽⁵⁹⁾

Indivíduos previamente infectados pelo sorotipo DEN-1 e posteriormente pelo sorotipo American DEN-2, tiveram discreta proteção cruzada contra o sorotipo DEN-2, que não foi suficiente para impedir a viremia e os sintomas, porém, foi eficiente para evitar as formas mais graves da doença. Provavelmente, tenha ocorrido recombinação entre os sorotipos DEN-1 e DEN-

2, possibilitando que o DEN-2 adquirisse antígenos do DEN-1, e que estes antígenos fossem responsáveis pela proteção parcial cruzada contra o sorotipo DEN-2 Americano.⁽⁵⁹⁾

1.5. Diagnóstico

1.5.1. Diagnóstico Clínico

Manifestações clínicas como: febre alta, cefaléia, artralgia, dor retroorbital ocorrem após 2 a 12 dias de incubação do vírus e podem permanecer durante 6 a 10 dias, seguidos de mialgia, anorexia, vômitos, prostração, dores intensas nas articulações e ossos. Linfadenopatia generalizada, hiperestesia cutânea, exantema máculo-papular, sintomas respiratórios (especialmente em crianças), podem ocorrer isolados ou simultaneamente. Menos frequentemente ocorrem fenômenos hemorrágicos de variado grau de intensidade: desde petéquias a sangramento de mucosas, especialmente intestinal, com provas laboratoriais de hemostasia, como prova do laço, positivas.⁽⁶⁰⁾

Semelhantes à dengue clássica, a febre hemorrágica por dengue (DHF) e a síndrome do choque por dengue (DSS), progridem rapidamente para prostração, irritabilidade, hipotensão, taquipnéia, cianose, sudorese, choque com fenômenos hemorrágicos, derrame pleural, hematomas, hepatomegalia, em variados graus, trombocitopenia, elevação do hematócrito, consumo de complemento, consumo de fibrinogênio, elevação dos produtos de degradação da fibrina (PDF) e hipoproteinemia. Choque, instala-se rapidamente revertendo-

se na grande maioria dos casos tratados com hidratação e/ou reposição de plasma.^(61,62)

Esta grande variedade de sinais e sintomas dificulta o diagnóstico diferencial entre dengue ou DHF e rubéola, influenza, febre tifóide, leptospirose, malária e outras doenças que na fase aguda apresentam sinais e sintomas gerais de síndrome viral não específica. Não há sinais ou sintomas patognomônicos de dengue ou DHF durante a fase aguda. Após a remissão da febre, distúrbios da hemostasia característicos tornam possível o diagnóstico clínico de DHF em muitos casos.⁽⁶⁾ Dengue, DHF e DSS apresentam freqüentemente leucopenia, trombocitopenia e hemoconcentração; a contagem de plaquetas é inferior ao limite mínimo de normalidade (inferior a 150.000/mm³), e ocorre 3 a 8 dias após o início dos sintomas. A hemoconcentração, decorrente do aumento da permeabilidade vascular e perda de plasma para o compartimento extravascular, está freqüentemente acompanhada de queda a pressão arterial. Não há destruição ou lesão do epitélio vascular durante o período de permeabilidade aumentada. Desde que o paciente seja estabilizado nas condições hemodinâmicas e comece a recuperar-se, o fluido extravasado é rapidamente reabsorvido, elevando a volemia e reduzindo os valores do hematócrito.⁽⁶⁾

1.5.2. Viremia

A viremia tem pico no início dos sintomas, ou imediatamente após e pode permanecer detectável por período de 2 a 12 dias dependendo das condições

imunológicas do paciente.^(50,63) Sugere-se que a severidade da doença seja determinada pelo número de células infectadas pelo vírus.⁽⁵⁵⁾ Durante a segunda infecção, o vírus dengue estará ligado a anticorpos produzidos contra o vírus dengue heterólogo da primeira infecção tornando-se praticamente indetectável pelas técnicas usuais de isolamento.

Estudos realizados na população de Toga (ilha do Oceano Pacífico), durante surto epidêmico de dengue causada pelo vírus DEN-2, revelaram grande variação da magnitude e duração da viremia nos casos de infecção primária:⁽⁵⁶⁾ pacientes foram monitorados com colheita de amostras de sangue diariamente, desde o início dos sintomas até 8 dias após. As amostras obtidas eram utilizadas para infectar mosquitos não contaminados (*A. aegypti* e *A. tabu*), para isolamento e quantificação do vírus e para realização de sorologia específica, utilizando a técnica MAC-ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM contra o vírus dengue sorotipo DEN-2. No momento da colheita, mosquitos não infectados foram colocados em contato com os indivíduos doentes. A maioria dos pacientes com soroconversão confirmada contra DEN-2 (pesquisa de IgM por técnica MAC-ELISA), revelou viremia indetectável por técnica de isolamento viral e por isodiagnóstico (contato direto do mosquito com o paciente). Nas amostras em que era detectável, a viremia era de curta duração (1 a 3 dias). Durante aproximadamente um ano este vírus (DEN-2) infectou grande parte da população de Toga causando, porém, sintomas de baixa intensidade, e revelando-se indetectável aos testes de isolamento. Por outro lado, em ilhas vizinhas à ilha de Toga, o mesmo vírus DEN-2 (confirmado por técnicas moleculares de diagnóstico) causou, durante três anos epidemias

“explosivas”, com severidade dos sinais e sintomas da doença. Os resultados sugeriram que o vírus teria variações do genoma, expressando comportamento epidêmico em períodos e regiões específicos e de circulação silenciosa em outros, causando nenhuma ou discreta sintomatologia.⁽⁵⁶⁾

1.5.3. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico definitivo da infecção por dengue é feito apenas em laboratório, através do isolamento viral, detecção de antígenos virais e do RNA viral em amostras de sangue ou tecidos e da pesquisa de anticorpos específicos no soro de pacientes.⁽⁵⁸⁾

Exames de sangue inespecíficos como o hemograma completo ou frações do hemograma (medida do hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem de plaquetas, contagem diferencial dos leucócitos) e prova do laço estão indicados para triagem de pacientes com potencial alteração da permeabilidade vascular, desta forma, são necessários para o estadiamento da doença (dependente da hemoconcentração, trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular) e definição da conduta terapêutica.⁽⁶⁴⁾

1.5.4. Isolamento e Identificação do Vírus Dengue

Várias culturas de células de vertebrados VERO (African Green Monkey), BHK 21 (Baby Hamster Kidney), LLC-MK2 (Rhesus Monkey Kidney) e inoculação do fluido supostamente infectado em cérebros de camundongos

recém nascidos (de 1 a 3 dias do nascimento),⁽⁶⁵⁾ têm sido descritos como métodos eficientes para o isolamento primário de *Flavivirus*, porém são de valor limitado no isolamento do vírus dengue, visto que, geralmente não é patogênico para camundongos recém nascidos e não produz efeito citopático (cpe) claro em culturas de células de vertebrados em “passagens” iniciais,⁽⁶⁶⁾ havendo em ambas as técnicas a necessidade de realizar inúmeras “passagens”, isto é, inoculações repetidas de espécimes de culturas “in vitro” ou animais infectados para não infectados.⁽⁶³⁾

A inoculação de espécimes em mosquito *Aedes albopictus* adulto⁽⁶⁶⁾ e menos freqüentemente em *Aedes aegypti*, *Toxyrhyngchities amboinensis* e *T. splendens*, mostrou-se sensível e específica, com positividade de 100% quando amostras de soro positivas eram utilizadas para inoculação intratorácica de mosquitos adultos.⁽⁶³⁾ Sendo hospedeiro natural, houve boa replicação do vírus inoculado, porém, habilidade na inoculação e manutenção do inseto vivo em laboratório são fatores limitantes da técnica.⁽⁶⁷⁾ Várias linhagens de células de insetos têm sido descritas e utilizadas para o isolamento do vírus dengue: *Aedes albopictus* (Clone C6/36), *Toxyrhyngchities amboinensis* (TRA 284), *Aedes pseudoscutellaris* (AP61),^(68,69) dentre outras, porém, a facilidade de cultivo, o crescimento rápido com meio de cultura simples, a replicação viral abundante⁽⁷⁰⁾ recomendam o uso do clone C6/36 de células do mosquito *Aedes albopictus*⁽⁷¹⁾ no isolamento de vírus dengue a partir de amostras obtidas de pacientes, animais e insetos, sendo também recomendada para propagação de outros *Arbovirus*.⁽⁷⁰⁾

Estudos comparativos das linhagens TRA-284-SFG (adaptado para crescimento em frasco de vidro), AP-61 originária do mosquito *Aedes pseudoscutellaris* e C6/36, demonstraram que a linhagem TRA-284 foi mais sensível à infecção pelo vírus dengue selvagem, porém é cultura celular de difícil manuseio, crescimento lento e freqüentemente apresenta monocamadas incompletas e grumos celulares. Por outro lado, o clone C6/36 originário do mosquito *Aedes albopictus* reúne todas as condições necessárias relativas ao fácil manuseio, manutenção indefinida em laboratório e replicação viral abundante.⁽⁷⁰⁾

A identificação dos vírus isolados pode ser feita por Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando-se anticorpos policlonais de camundongos infectados com vírus dengue ou anticorpos monoclonais adquiridos comercialmente, permitindo neste caso a identificação do sorotipo isolado.⁽⁷²⁾ O método de Imunofluorescência Direta dispensa a utilização do anticorpo intermediário, apenas o anticorpo conjugado monoclonal anti-dengue, “marcado” com isotiocianato de fluoresceína, é aplicado sobre cultura de células infectadas e, havendo positividade, a fluorescência é observada.

Técnicas de biologia molecular para o diagnóstico do dengue permitiram o desenvolvimento de testes com relativa sensibilidade e boa especificidade: a detecção do genoma viral por hibridização do ácido nucleico “in situ” e por métodos como “Southern blot” e “Northern blot”, usando fragmentos de RNA ou oligonucleotídeos sintéticos marcados, tem se mostrado bastante útil para o diagnóstico do dengue.⁽⁷³⁾ A reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction - PCR), utilizada amplamente em recentes estudos do vírus dengue,

pode ser aplicada em amostras de soro ou tecido infectado gerando boa quantidade de material genético em poucas horas de reação, possibilitando o diagnóstico ou estudo do genoma do vírus por seqüenciamento dos nucleotídeos gerados.^(74,75) Tal procedimento combina a reação de transcrição reversa do RNA viral, para obtenção do DNA complementar (cDNA), com amplificação em um único frasco de reação. Nesta PCR padrão, iniciadores determinados para “anelar” com o genoma de qualquer dos quatro sorotipos do dengue, amplificam um produto de 511 pares de bases, que é submetido a uma segunda PCR (nested PCR) com iniciadores tipo – específico. O produto amplificado pode ser visualizado mediante eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida como “bandas de DNA” de tamanho característico para cada sorotipo, visto que cada iniciador “anela” em diferentes posições, originando fragmentos de 482 pares de bases para DEN-1, 392 pares de bases para DEN-4, 290 pares de bases para DEN-3, e 119 pares de bases para DEN-2.

1.5.5. Diagnóstico Sorológico

Testes sorológicos que identificam a presença de anticorpos específicos são amplamente usados por laboratórios clínicos para diagnóstico da dengue, como Inibição da Hemaglutinação (HI),⁽⁷⁶⁾ com hemácias ligadas com determinantes antigênicos. Trata-se de teste sensível, de fácil execução e que requer instrumental simples. É ideal para estudos soropidemiológicos, visto que os anticorpos inibidores da hemaglutinação surgem na primeira semana após o início dos sintomas e permanecem por longos períodos, Reação de

Fixação do Complemento (RFC):⁽⁴⁴⁾ teste de baixa especificidade identificando apenas o consumo do complemento na formação do complexo antígeno-anticorpo.⁽⁷⁷⁾ Os anticorpos fixadores do complemento aparecem mais tardiamente que os inibidores da hemaglutinação (duas semanas após o início dos sintomas) e podem permanecer em títulos moderados ou altos por períodos prolongados (dois anos ou mais).

Teste de Neutralização (NT) usado para identificação do vírus a partir de anticorpos da amostra:⁽⁷⁸⁾ a neutralização viral é definida como a perda da infectividade através da reação dos vírus com o anticorpo específico. Anticorpos neutralizantes podem ser medidos por teste “*in vivo*” e “*in vitro*”, desde que um sistema de cultura de tecido susceptível seja obtido. Diluições seriadas da cultura infectada frente ao soro com alto teor de anticorpos ou diluições seriadas do vírus e diluição constante do soro são procedimentos padrão para testes de neutralização e são expressos em índice de neutralização (ILN), LOG 10, ou um antilogaritmo.

Ensaio Imunoenzimático por “captura” de imunoglobulinas de classe IgM,⁽⁷⁹⁾ que possibilita a detecção de anticorpos anti-vírus dengue não específicos para sorotipos, indicando infecção recente, e não detectando infecções simultâneas por outros *Flavivirus*.^(79,80) Os anticorpos IgM anti-dengue desenvolvem-se rapidamente, podendo ser detectados em 80% dos pacientes com 5 dias de sintomas e em 99% dos pacientes com 6 a 10 dias de sintomas, persistindo por até 90 dias após o início dos mesmos.

O Ensaio Imunoenzimático também pode ser utilizado em culturas celulares do clone C6/36 infectadas (utilizadas como substrato da reação), com

objetivo de verificar a presença de anticorpos específicos em amostras de soro ou plasma suspeitos, tendo sido utilizada em inquéritos sorológicos em grandes epidemias de dengue, objetivando detectar anticorpos específicos das classes IgM e IgG, variando a antiimunoglobulina utilizada, isto é, anticorpos monoclonais produzidos contra Frações Constantes (Fc) de IgM e IgG. É considerada técnica confiável e econômica para o diagnóstico sorológico de infecções primárias e secundárias por diferentes sorotípos do vírus dengue e outros *Flavivirus*.

A presença de anticorpos contra *Flavivirus*, que não o vírus dengue, é causa de freqüentes reações cruzadas quando se utiliza técnicas como RFC, HI ou NT.⁽³⁴⁾

1.5.6. Aglutinação do Látex

Técnica descrita por Singer e Plotz, em 1956,⁽⁶³⁾ que utiliza como “fase sólida” partículas esféricas de poliestireno látex conjugadas com gamaglobulinas ou imunoglobulinas específicas contra determinantes antigênicos de proteínas, microorganismos ou outras imunoglobulinas.

Estudos preliminares⁽⁸¹⁾ com partículas de polivinil tolueno e poliestireno látex revelaram que, apesar de biologicamente inertes, quando utilizadas em dimensões apropriadas, uniformes e adicionadas a gamaglobulinas, podem ser úteis em estudos sorológicos e propuseram a substituição de eritrócitos de seres humanos, de aves ou de outros animais por estas partículas biologicamente inertes, mantendo assim, o princípio da aglutinação

macroscópica e suas vantagens, como: poucas “passagens” de execução, visualização macroscópica da reação e utilização de instrumental simples e de baixo custo. Acrescendo-se a facilidade de aquisição do látex comercialmente em diversos diâmetros e a possibilidade de estocagem por tempo indeterminado.

Descrita originalmente para pesquisa de fator reumatóide⁽⁸¹⁾ no sangue, a técnica de aglutinação do látex é utilizada para diagnóstico de doenças infecciosas bacterianas e virais, detecção de proteínas plasmáticas de fase aguda, detecção de anticorpos plasmáticos e de hormônios.

A literatura consultada, constante das referências bibliográficas do presente trabalho, não revelou a disponibilidade de técnicas de baixo custo e fácil execução, que dispensassem instrumental específico, para a pesquisa de antígenos do vírus dengue em amostras de pacientes ou amostras de laboratório, já que as técnicas moleculares demandam grandes investimentos em aparelhos e insumos importados, além de recursos humanos com alto nível técnico, sendo assim inviável para pequenos laboratórios de rotina, serviços de saúde distantes dos grandes centros, clínicas, consultórios e postos de saúde de grande parte do nosso país.

1.6. Objetivos

Padronizar método de aglutinação do látex (partículas esféricas de poliestireno) marcado com anticorpos específicos para detectar antígenos do vírus dengue em amostras de fluído cerebral de camundongos Swiss recém nascidos (1 a 3 dias) infectados por via intracerebral com sorotipo DEN-1 cepa *Moshizuki*.

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Amostra Viral: Obtenção do Antígeno

O isolado de vírus dengue cepa *Mochizuki*, cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, chefe da Unidade de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foi propagado com a infecção de células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36⁽⁷¹⁾ cultivadas em frasco de cultura de células de 75cm³ (Corning Corp. – USA), contendo meio de cultura Leibowitz L15 (Gibco Corp.- USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco Corp. – USA) inativado pelo calor, 10% de caldo de triptanol fosfato, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Inc. – USA), mantido em temperatura de 28 °C em estufa de cultura (Lactea Continental - BR).

Observado diariamente em microscópio invertido (Zeiss – Germany), no sétimo dia identificou-se efeito citopático (cpe) discreto nas células infectadas, que foram descoladas por agitação, aliqüotadas em tubos de microvolume de 1,5mL (Brand – Germany) e estocadas em congelador a -70°C negativos (Forma Scientific Inc. – USA).

Imediatamente antes de serem aliqüotadas, 40µL da suspensão de células infectadas e o mesmo volume de suspensão de células não infectadas foram aplicados lado a lado em dois “spots” de lâmina de microscopia (Perfecta 26x76 mm – BR), secos sob ar aquecido e imersos em acetona gelada (4°C) (Merck – Germany) durante vinte minutos para fixação. Após serem secos novamente com ventilação aquecida, 40µL de FA (Fluído Ascítico) diluído 1/20

em PBS (Laborclin – BR) pH 7,5 (Medidor de pH Orion 410 A – USA), foram aplicados e incubados durante 30 minutos a 37°C em estufa de cultura e câmara úmida. Após lavagem com PBS (phosphat buffer solution) por imersão durante 10 minutos em homogenizador (Agitador Orbital 255, Fanem – BR) em baixa rotação (60 x g) e secagem completa por ventilação aquecida, foram aplicados 10 µL de conjugado “anti-mouse” IgG (Sigma Inc. – USA) marcado com Isotiocianato de Fluoresceína titulado 1/100 em PBS pH 7,5. Após a incubação a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos, lavou-se a lâmina com PBS pH 7,5 por imersão e homogeneização (60 x g) durante 10 minutos e com água destilada (Destilador Quimis 10 – BR) e deionizada (Deionizador Permution - BR) durante 5 minutos de imersão com leve homogeneização (60 x g) e secas sob ventilação forçada. Observação ao microscópio de luz ultravioleta (Nikon Labophot – Japan) com prévia preparação da lâmina com óleo de imersão para microscopia (Laborclin – BR) e lamínula (Perfecta 24x60 mm – BR) revelou intensa fluorescência pontilhada, intracelular, revestindo toda superfície nuclear e grande parte do citoplasma celular (**Figuras 1 e 2**). Alguns pequenos aglutinados celulares revelaram intensa fluorescência fazendo suspeitar de artefato, próprio da técnica. Nos “spots” com células não infectadas não foi observada fluorescência. (**Figuras 3 e 4**)

2.2. Flúido Ascítico: Obtenção de Anticorpos

Flúidos ascíticos ricos em anticorpos (FAI) foram obtidos utilizando-se vinte camundongas jovens virgens (*Mus – musculus* – variedade albino suíço),

que receberam quatro inoculações intraperitoneais, com intervalos regulares de sete dias, de 50 μ L de suspensão de macerado de cérebro de camundongos recém-nascidos (*Mus – musculus*, variedade albino) infectados com suspensão de células C6/36, infectadas com vírus dengue 1 – cepa *Moshizuki* diluída 1/20 em solução salina tamponada (Labosynth – BR) e previamente centrifugada a 1200 x g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf – Germany) durante 5 minutos com inoculação intracerebral de 20 μ L, utilizando-se seringas de 1mL e agulhas hipodérmicas (Becton Dickinson – USA). Os camundongos recém nascidos infectados com 20 μ L de suspensão de C6/36 positiva para vírus dengue, foram mantidos com a mãe em ambiente de biotério e após quatro dias do inóculo apresentaram sinais de perda da capacidade de deslocamento sendo que 30% morreram e foram desprezados; o restante foi sacrificado e congelado a 70 °C negativos. A suspensão de macerado cerebral obtida por punção com seringas de 5mL e agulhas 20 x 35 (Becton Dickinson – USA) da massa encefálica dos camundongos recém nascidos descongelados e mantidos à temperatura ambiente em cabine de segurança classe II com fluxo de ar laminar (FLV Technik – BR), foi diluída na razão de 1 /20 em solução tamponada borato (Nuclear CAQ – BR) / cloreto de sódio (solução salina) pH 8,5 e centrifugada a 1600 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804 R – Germany).

Concomitantemente à quarta inoculação intraperitoneal do fluído cerebral, foram inoculados por via intraperitoneal 200 μ L de suspensão de células de sarcoma 180/TG (Thioguanidine resistant), **(Figuras 5 e 6)** desenvolvendo ascíte volumosa após oito dias. **(Figuras 7 e 8)**

Obtido por paracentese realizada uma única vez nos animais que desenvolveram ascite volumosa até o oitavo dia, o fluido ascítico rico em anticorpos específicos anti-dengue 1 foi centrifugado a 1600 x g (KK Centrifuge PLC Series Gemmy Corp. – Taiwan), durante 15 minutos, separando-se o sobrenadante e desprezando-se o precipitado de células. Foram estocados 10mL, do volume final, em congelador a -20 °C (Electrolux H 300 – BR), e 10mL foram acrescidos a mesmo volume de solução aquosa de sulfato de amônia (Merck Inc. – Germany) 40%, mantido à temperatura de 4 °C (Electrolux R 280 – BR), gota a gota durante 30 minutos e imediatamente centrifugados a 1600 x g durante 20 minutos em centrífuga refrigerada. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante, ressuspendendo-se o precipitado de imunoglobulinas em PBS e, procedendo-se a diálise durante 24 horas com água corrente em membrana (Amicon PM – 30 – USA) e estocando-se o “dializado” em congelador a -20 °C. Posteriormente, foi realizada eletroforese de proteínas em gel de agarose que revelou concentração de 0,6 g/dL de gamaglobulinas e baixa concentração de albumina (0,9 g/dL).

Considerado como teste confirmatório da presença de anticorpos anti-dengue 1 nos fluídos ascíticos (FA), a imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente utilizando substrato de células clone C6/36 infectadas com dengue 1 cepa *Mochizuki*, titulação dos FA à razão de 1/20 em PBS pH 7,5 e conjugado anti - IgG mouse (Sigma Inc. – USA), revelando intensa fluorescência e confirmando a presença de anticorpos anti-dengue. **(Figuras 9 e 10)**

2.3. Aglutinação do Látex

Suspensão a 10% de esferas de poliestireno (látex) de 800 μ m, cedidas pelo Laboratório Laborclim, foi diluída na razão de 1/50 em tampão salina (PBS) pH 7,5 (solução estoque) (**Figuras 11 e 12**) e mantida em geladeira a 4°C; 40 μ L da solução de anticorpos anti dengue 1 extraídos dos FA diluídos na razão de 1/20 em solução tamponada borato / salina pH 5,5 a 9,5, com intervalo de escala de 0,5, foram adicionados a 20 μ L de solução estoque de látex (suspensão de látex “marcados” com imunoglobulinas), incubando-se em câmara úmida a 37°C durante 40 minutos.⁽⁶³⁾ Em seguida, 40 μ L de fluido cerebral de camundongos recém nascidos saudáveis, previamente diluído na razão de 1/20 em solução salina pH 8,0 (controle negativo), e 40 μ L de fluido cerebral de camundongos recém nascidos infectados com DEN-1 cepa *Mochizuki* previamente diluído nas mesmas condições que o controle negativo, foram aplicados à lâmina de microscopia comum (Perfecta 26x76 – BR), juntamente com 20 μ L da suspensão de látex marcado com anticorpos anti-dengue e incubados durante 60 a 360 minutos, com intervalos de observação de 60 minutos a 37°C em câmara úmida. (**Figuras 13, 14 e 15**)

2.4. Cálculo da Dose Letal – DL 50

O cálculo da dose letal 50 (DL 50) foi realizado utilizando 30 camundongos (*Mus-musculus*, variedade *albino*) recém nascidos (1 a 3 dias), divididos em grupos de 5 animais, mantidos com a mãe, que receberam

inoculação por via intracerebral de 20µL de diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-7}) de solução do macerado de cérebro de camundongos recém nascidos infectados com dengue 1 cepa *Mochizuki* (confirmada a positividade da infecção por imunofluorescência indireta com anticorpos específicos anti DEN-1 *Mochizuki*) diluído na razão de 1/20 em PBS (considerada solução estoque). Concomitantemente, seis animais do grupo, receberam inoculação intracerebral de (mesmo volume e diluição) macerado de cérebro de camundongo recém nascido não infectado com vírus dengue, sendo considerado controle negativo do procedimento.

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente até o 14^o dia de inóculo, registrando-se o número de mortos e sobreviventes. O cálculo da DL 50 foi feito segundo método descrito por Reed e Muench, 1938.⁽⁸²⁾

2.5. Reativos e Soluções

Foram empregados:

Solução de Cloreto de Sódio / Solução Salina 1,5 M

Cloreto de Sódio (NaCl)	87,75g
Água destilada / deionizada q.s.p	1000mL

Solução de Hidróxido de Sódio (1 N)

Hidróxido de Sódio (NaOH).....	20g
Água destilada / deionizada q.s.p	500mL

Solução de Ácido Bórico 0,5M

Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	52,55g
Água destilada / deionizada q.s.p.	1700mL

Solução Tamponada Ácido Bórico / Cloreto de Sódio

Solução Cloreto de Sódio 1,5 M.....	80mL
Solução de Ácido Bórico 0,5 M	100mL
Solução de Hidróxido de Sódio 1 N.....	24mL
Água destilada / deionizada q.s.p.	1000mL

Solução tamponada Fosfato (PBS)

Na ₂ HPO ₄ (anidro).....	42,36g
KH ₂ PO ₄	14g
NaCl	85g
Água destilada / deionizada (sol. concentrada) q.s.p.	1000mL
Água destilada / deionizada (sol. para uso)	10000mL

Meio Leibovitz - L 15 modificado

Meio L15	13,36g
Triptose Fosfato a 2,95 %	100mL
Soro Fetal Bovino.....	50mL
Penicilina.....	10000U
Estreptomicina	10000µg
Água destilada / deionizada q.s.p.	850mL

Glicerol Tamponado PH 7,5

PBS pH 7,5 1 volume
Glicerol 9 volumes

Tampão Carbonato 0,1 M

Na₂CO₃ 1,59g
NaHCO₃..... 2,39g
Água destilada / deionizada q.s.p 1000mL

Albumina Bovina 4%

Albumina Bovina 4g
PBS pH 7,4 q.s.p. 100mL

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de aglutinação de partículas de látex (poliestireno) conjugadas com imunoglobulinas, frente ao antígeno correspondente, tornou-se desde a descrição original por Singer e Plotz publicada em 1956,⁽⁶³⁾ método de primeira escolha em situações clínicas em que o diagnóstico laboratorial deve ser imediato, quando não se dispõe de recursos de instrumental específico, ou quando são escassos os recursos financeiros para aquisição de equipamentos e consumíveis de técnicas mais modernas e laboriosas.

Esforços para o desenvolvimento de vacinas contra o dengue tiveram início há mais de 50 anos, quando se reconheceram os casos graves da doença; sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde como prioridade.⁽⁸³⁾ A existência de lacunas no conhecimento sobre a estrutura do vírus dengue, epítomos responsáveis pela ligação e penetração nas células do hospedeiro, assim como a indução da resposta imunológica, dificultam o desenvolvimento de vacinas. Também não há conhecimento suficiente sobre a taxa de mutação do vírus selvagem.⁽⁸⁴⁾

Apesar de existirem diversas vacinas em teste, contendo vírus inativados, componentes proteicos do vírus (produzidos por técnicas de engenharia genética) e de DNA viral, ainda não foram realizados estudos suficientes sobre a eficácia e segurança em seres humanos. Estima-se que nenhuma vacina estará disponível nos próximos anos para a prevenção da dengue e que o controle da doença neste período será possível apenas evitando a proliferação do vetor.⁽⁸⁵⁾

Nos períodos epidêmicos, devido à grande demanda de casos clínicos compatíveis com dengue, à sobrecarga de trabalho do laboratório e ao desinteresse do paciente após a fase aguda de enfermidade, torna-se inviável agendar colheitas de sangue para confirmação laboratorial para momento posterior ao da primeira consulta que regularmente ocorre antes do quinto dia da doença, assim, parte dos resultados negativos encontrados em pacientes com suspeita de dengue, pode ser consequência da época de colheita das amostras de sangue, geralmente feitas antes do quinto dia da doença.⁽⁸⁶⁾

Cobos *et al.*⁽⁸⁷⁾ utilizaram amostras de sangue de pacientes definidos como casos prováveis de dengue, mantidas em criotubos esterilizados de 1 mL e divididas em dois grupos: para realizar o isolamento viral de amostras de pacientes com tempo de sintomas de até 5 dias, e sorologia para aqueles que referiam mais de 5 dias de sintomas, todas mantidas a 70°C negativos. Foi utilizada a técnica de ensaio imunoenzimático de captura de IgM, em que microplacas de fundo plano foram impregnadas com anticorpos de cabra anti IgM humana à concentração ótima diluída com PBS 1x pH 7,2 e mantidas a 4 graus centígrados durante 24 horas.

As amostras, soros controle positivos e negativos foram diluídos à razão de 1:40 com PBS 1x, contendo 2% de leite de vaca desnatado e incubado a 37 graus centígrados em câmara úmida durante 2 horas. Em seguida foram lavados com PBS 1x, contendo tween 20 a 0,05%, utilizando-se antígeno do vírus DEN-1 cepa *Hawai* inativado. Utilizou-se conjugado anti-*flavivírus* 6b-6c marcado com peroxidase diluído 1:6000 incubando-se a 37 graus centígrados em câmara úmida durante 1 hora. Lavados com PBS 1x e acrescentado

substrato específico (10 mg OPD, e 25 ml de tampão citrato em pH 5), incubados em câmara úmida durante 30 minutos à temperatura ambiente e finalizada a reação com adição de ácido sulfúrico 2N.

Examinadas em leitora ELISA 490 nm (nanômetros), calculou-se o valor de corte e a determinação de positividade e negatividade de cada amostra examinada.

Em 742 amostras de casos prováveis de dengue obteve-se 19,1% positivos, 75,1% indeterminados e 4,3% negativos, 2,0% não foram utilizados. O isolamento viral e sua respectiva tipificação, resultou positivo em 5,7% das 742 amostras, representando 29,6% do total de casos positivos.

Observam os autores que as amostras consideradas indeterminadas (75,1% do total) teriam resultado definitivo se houvesse uma segunda amostra, visto que provavelmente o resultado se devesse à baixa concentração de anticorpos circulantes no momento da colheita das amostras; porém, por vários motivos, nenhum dos pacientes se submeteu a nova punção. Desta forma, devido à quantidade de amostras indeterminadas, é necessário contar com um plano estratégico dos sistemas de saúde, a fim de garantir a obtenção de uma segunda amostra de sangue e poder confirmar o primeiro teste e conhecer a magnitude da epidemia.⁽⁸⁷⁾

Rodriguez *et al.*⁽⁸⁸⁾ analisaram amostras de sangue de 117 crianças atendidas em ambulatório de pediatria de Hospital Universitário, que apresentavam sintomas e sinais sugestivos de dengue, em período epidêmico. Obtiveram positividade para a doença em 50,4% dos pacientes. Utilizaram para o diagnóstico etiológico: PCR e pesquisa de IgM anti-dengue em crianças com

até 5 dia de febre, e IgM e IgG anti-dengue em crianças com mais de 5 dias de febre. Os exames sorológicos foram realizados utilizando técnica variante do ELISA chamada Ultramicro – ELISA desenvolvido pelo Centro de Imunoensaios de Cuba,⁽⁸⁹⁾ para pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM anti-dengue. Os testes de PCR foram realizados utilizando “primers” desenvolvidos por Lanciotti *et al.*⁽⁹⁰⁾ e foram positivos em 35 casos, detectando-se os sorotipos DEN-2 (80,0%), DEN-1 (14%) e DEN-3 (6,0%).

Os autores verificaram que não houve associação estatisticamente significativa entre a dengue e a maioria dos sintomas analisados, considerados típicos da doença. Cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia e artralgia, sintomas tipicamente atribuídos à dengue, tiveram freqüência semelhante aos grupos com sorologia positiva e negativa. Prostração esteve presente em 80% das crianças. Somente o exantema associou-se mais à dengue, com prevalência de 1,49 vezes maior, nos casos positivos. Dor de garganta, coriza e tosse, que são sintomas de doenças respiratórias agudas foram detectados em crianças com dengue. Manifestações hemorrágicas foram pouco freqüentes e a prova do laço, realizada em 74 crianças positivas e negativas, foi positiva em 13,5% dos casos positivos e 5,5% dos casos negativos.

Concluem os autores que se o diagnóstico fosse baseado nos critérios do Ministério da Saúde, que considera caso confirmado de dengue aquele que apresentar IgM positiva associada a quadro clínico e epidemiológico,⁽⁹¹⁾ metade das crianças com dengue não teriam diagnóstico correto. Sintetizam que os resultados indicam que é difícil diferenciar clinicamente a dengue de outras doenças febris da infância, não se devendo dissociar a clínica da

epidemiologia. O apoio diagnóstico do laboratório clínico é fundamental, principalmente em períodos de baixa incidência.

Marzochi⁽⁹²⁾ observou a necessidade do planejamento da vigilância clínica da dengue visando o aumento da sensibilidade e ao mesmo tempo da especificidade do diagnóstico das doenças febris agudas que constituem os diagnósticos diferenciais, independentemente da gravidade com que se apresentam, dispensando igual atenção às formas brandas e moderadas dos quadros clínicos. É preciso reiterar a obviedade de que, necessariamente, na organização do sistema de vigilância da dengue, o componente clínico precede a ação laboratorial e a epidemiológica e, se o profissional de saúde não estiver devidamente preparado e motivado, não proporcionará notificação adequada e muito menos poderá colaborar com o envio de amostras de sangue dos pacientes com doenças semelhantes à dengue e de todos que apresentem qualquer tipo de manifestação hemorrágica ou síndrome viral que evolua ao óbito.

Neste estudo, buscamos comprovar a possibilidade de diagnosticar a presença do vírus dengue pela técnica de aglutinação do látex, em amostras comprovadamente positivas pelos métodos de isolamento viral e imunofluorescência indireta, descritos em Material e Métodos, item 2.1. Amostra viral: obtenção de antígeno.

A concentração dos anticorpos extraídos dos FA, de 0,05 g/mL de solução em PBS com pH 7,5, revelou-se ideal para conjugação das partículas de látex, visto que concentrações superiores, a partir de 0,08 g/ mL causaram aglutinações espontâneas, imediatamente após a adição da solução de

anticorpos à suspensão de látex.⁽⁶³⁾ Concentrações inferiores à utilizada, desde 0,04 g/mL até 0,01 g/mL não promoveram aglutinação visível frente ao antígeno.

Considerando que a reação de aglutinação do látex é pH dependente,⁽⁶³⁾ e que reações de hemaglutinação variam a faixa de pH ideal para diferentes *Arbovirus*,⁽⁹³⁾ a solução tamponada borato / salina foi utilizada com pH variando entre 5,5 e 9,5 com intervalos de 0,5. Mantendo condições inalteradas de concentração de imunoglobulinas, concentração do látex, temperatura e umidade. As reações com pH de 8,5 foram mais intensas e reprodutíveis. Reações com tampão de pH inferior ao ideal revelaram discreta aglutinação, em pequenos grumos, visíveis apenas ao microscópio óptico comum (Nikon), em objetiva 10x. **(Figura 16)** Reações com tampão de pH superior ao ideal e até 9,5 não revelaram aglutinação. Nas reações com pH entre 5,5 e 7,5 ocorreram aglutinações espontâneas, antes da adição do antígeno.

A concentração de partículas de látex, originalmente a 10% em água, foi examinada progressivamente em diluições com solução tamponada borato / salina pH 8,5 de 0,01% a 0,05%, sendo a suspensão com concentração de 0,02% ideal para visualização macroscópica da aglutinação.

A dose letal de 50% dos animais infectados foi obtida conforme resultados e cálculos constantes na Tabela 1.

Tabela 1. Diluição do inóculo e mortalidade.

Diluição	Mortos	Vivos	Mortalidade	Total de Mortos	Total de Vivos	Taxa de Mortalidade	(%) de Mortalidade
10^{-2}	5	0	5/5	21	0	21/21	100
10^{-3}	5	0	5/5	16	0	16/16	100
10^{-4}	4	1	4/5	11	1	11/12	92
10^{-5}	3	2	3/5	7	3	7/10	70
10^{-6}	3	2	3/5	4	5	4/9	44
10^{-7}	1	4	1/5	1	9	1/10	10

Os valores acumulados para o total de animais que morreram ou sobreviveram foram obtidos pela soma nas direções vertical para cima (animais mortos) e para baixo (animais vivos). A taxa de mortalidade acumulada, representou o número acumulado de animais mortos, dividido pelo total acumulado de animais inoculados. Assim, a mortalidade na diluição 10^{-5} foi superior a 50%, e na diluição 10^{-6} inferior a 50%. A distância proporcional da mortalidade 50% que liga estas duas diluições, foi obtida pela fórmula:

$$DL\ 50 = \frac{\% \text{ mortalidade acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ mortalidade acima de } 50\% - \% \text{ de mortalidade abaixo de } 50\%}$$

Considerando que a distância entre duas diluições está relacionada ao fator usado para prepará-las, é necessário corrigir a distância proporcional pelo logaritmo negativo do fator de diluição. Portanto $\log 10 = 1$. Desta forma, a partir dos valores obtidos:

$$DL50 = \frac{70 - 50}{70 - 44} = 0,8$$

Valor interpolativo= - 0,8

A diluição associada à mortalidade de 50% dos animais inoculados manteve-se entre 10^{-5} e 10^{-6} .

O log 10 da dose letal 50% foi obtido pela soma do valor interpolativo corrigido ao log da diluição acima de 50% = $-5 + (-0,8) = -5,8$.

A diluição da amostra viral, letal para 50% dos animais inoculados foi estimada em $10^{-5,8}$.

Portanto DL 50 = -5,8 e a concentração de partículas virais estimada foi de 800×10^3 partículas virais/mL ou 16×10^3 partículas / volume inoculado.

A solução do macerado cerebral de camundongos de 1-3 dias infectados com vírus dengue, que apresentou concentração em DL 50 de 800×10^3 partículas virais em cada mililitro da diluição, e DL 50 de $10^{-5,8}$, conforme método descrito por Reed e Muench,⁽⁸²⁾ inicialmente diluída à razão de 1/20 em solução tamponada borato / salina pH 8,5 foi examinada com diluições seriadas de 10^1 a 10^{-9} . Reações visíveis macroscopicamente ocorreram com concentrações variando entre 10^0 (com maior intensidade e discreta aglutinação espontânea) e 10^{-2} (com forte intensidade e nenhuma aglutinação espontânea). Reações com diluição de 10^{-3} revelaram discreta aglutinação, visível apenas ao microscópio óptico comum com objetiva 10x. Reações com diluição de 10^{-4} ou superior não apresentaram aglutinação. Observamos a

grande “distância” entre a dose letal para 50% dos animais inoculados com vírus dengue ($10^{-5,8}$) e a diluição capaz de aglutinar as partículas de látex marcadas com anticorpos específicos (entre 10^{-3} e 10^{-4}), porém são métodos diferentes de diagnóstico, e portanto, com níveis de sensibilidade diferentes e não comparáveis entre si.

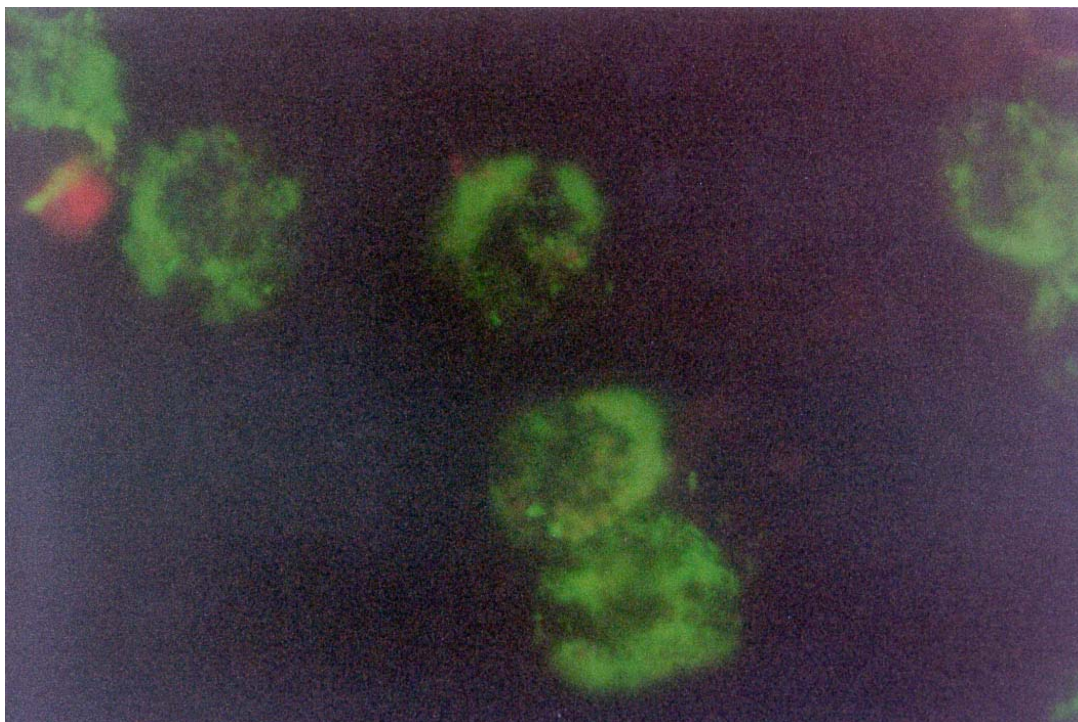
Apesar da meta deste estudo ser o desenvolvimento de “teste rápido” e, portanto em temperatura ambiente e curto período de incubação, estas variáveis não puderam ser reduzidas. O tempo de incubação para a estabilização da reação foi de seis horas; e quando reduzido em uma hora, inibiu totalmente a reação. A temperatura de 37°C em câmara úmida, deve ser constante, visto que temperaturas, variando entre 22°C e 36°C inibiram a aglutinação; e temperaturas superiores a 37°C variando até 56°C promoveram com tempo de incubação muito curto (5 a 15 minutos) aglutinações espontâneas, dispersas e sem reprodutibilidade.

A padronização adequada do método de aglutinação do látex para detecção do vírus dengue, dependerá da avaliação identificação e correção de possíveis interferentes e inibidores da formação do complexo antígeno anticorpo e da aglutinação das partículas de látex ligadas a este complexo.

Considerando que os possíveis interferentes estejam eliminados e que a sensibilidade da técnica alcançou diluições da ordem de $3,0 \log_{10}$ a $4,0 \log_{10}$ visto que diluições intermediárias não foram consideradas, haveria possibilidade de aplicação do método em amostras de pacientes com suspeita de febre por dengue. O sorotipo DEN-1 é detectável em amostras de pacientes com até seis dias de sintomas⁽⁹⁴⁾ pelo método de inoculação de fração da

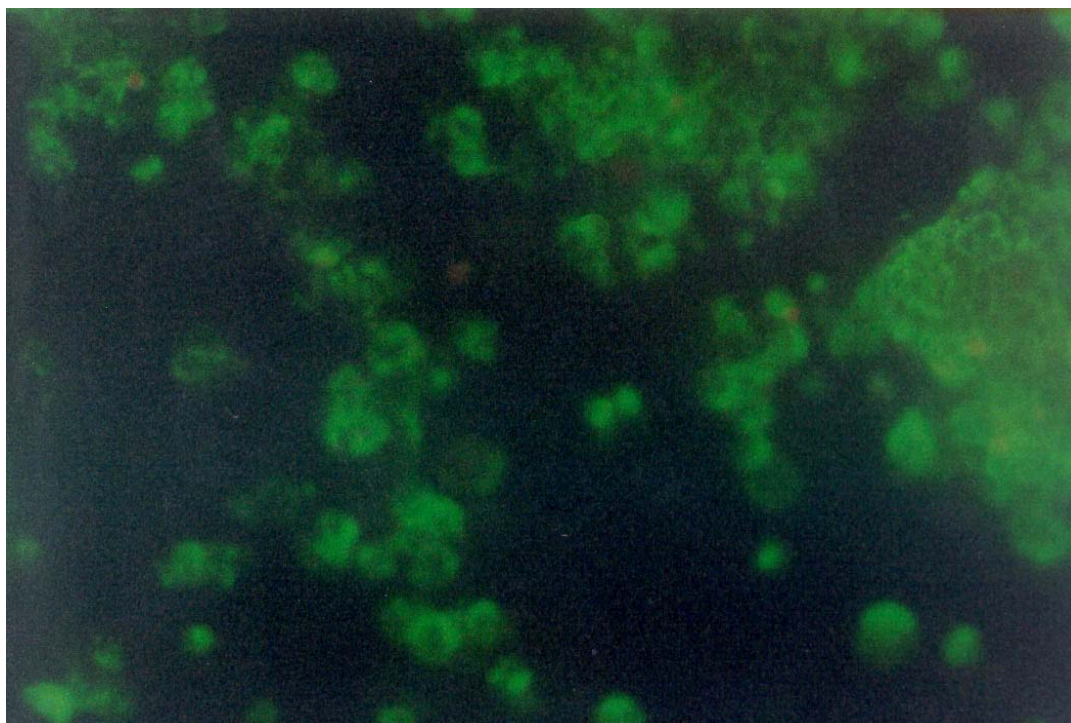
amostra de sangue por via intratorácica em mosquitos *A. aegypti* ou *A. albopictus*, em títulos de $3,8 \log_{10}$ a $8,0 \log_{10}$.⁽⁹⁴⁾

Portanto a magnitude da viremia em amostras de pacientes seria detectável pelo método proposto, demonstrando a possibilidade real de utilização para detecção e diagnóstico precoce do vírus dengue.



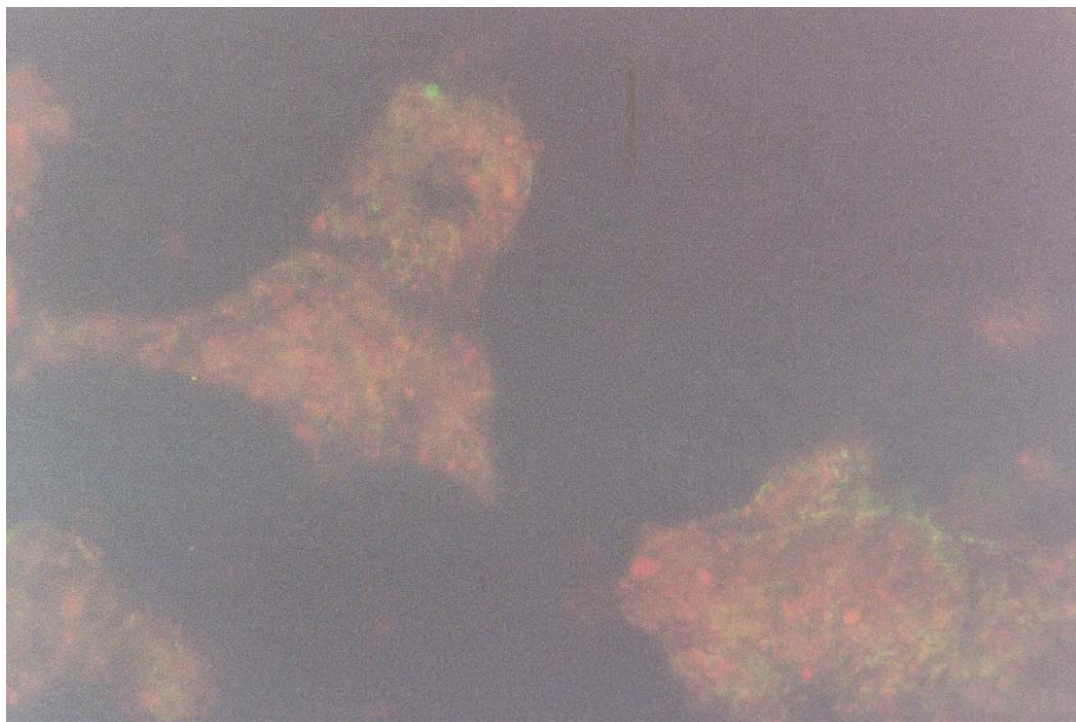
Microscópio Olympus Bx600 Objetiva 1000x; filtro verde; tempo de exposição: 3 segundos.

Figura 1. Imunofluorescência indireta positiva em células clone C6/36 infectadas com DEN-1 *Moshizuki*.

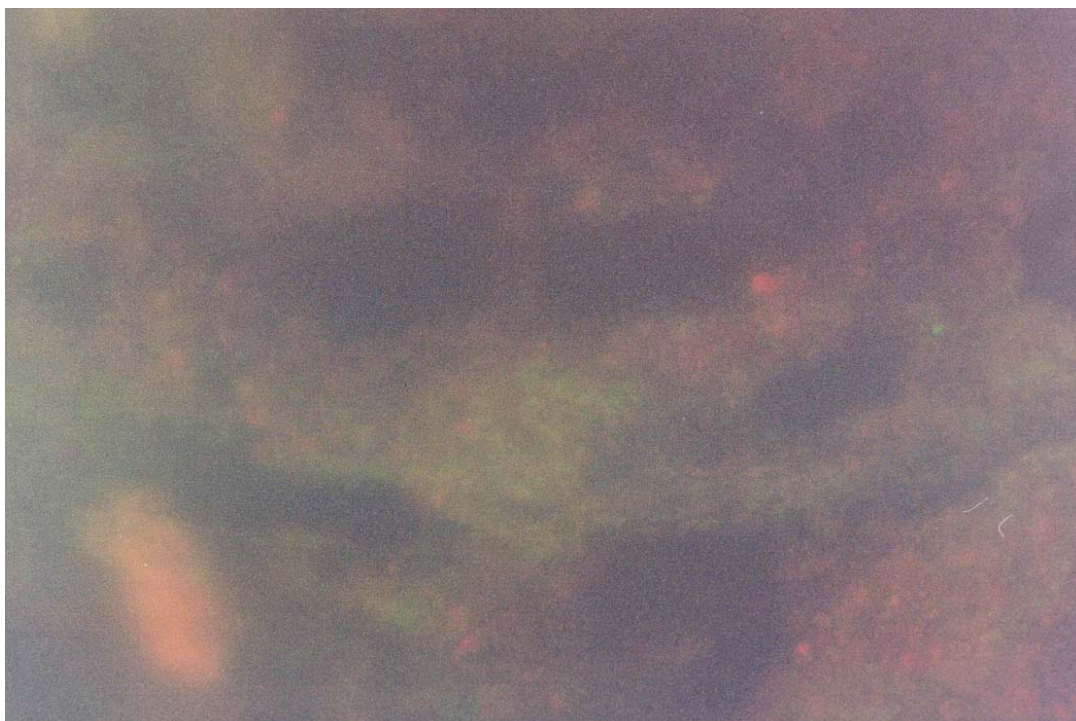


Microscópio Olympus Bx600, Objetiva 20x; filtro verde; tempo de exposição: 23 segundos.

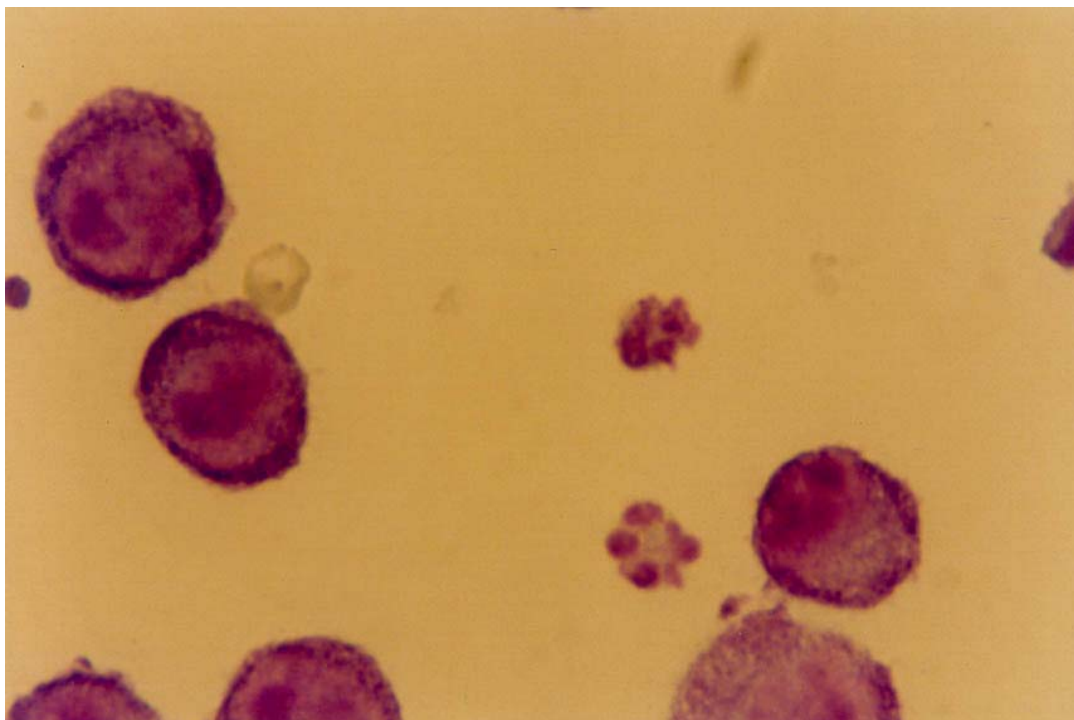
Figura 2. Imunofluorescência indireta positiva em células clone C6/36, infectadas com DEN-1 *Moshizuki*.



Microscópio Olympus Bx600, Objetiva 20x; filtro verde; tempo de exposição: 6,4 segundos.
Figura 3. Imunofluorescência indireta em células clone C6/36 não infectadas.

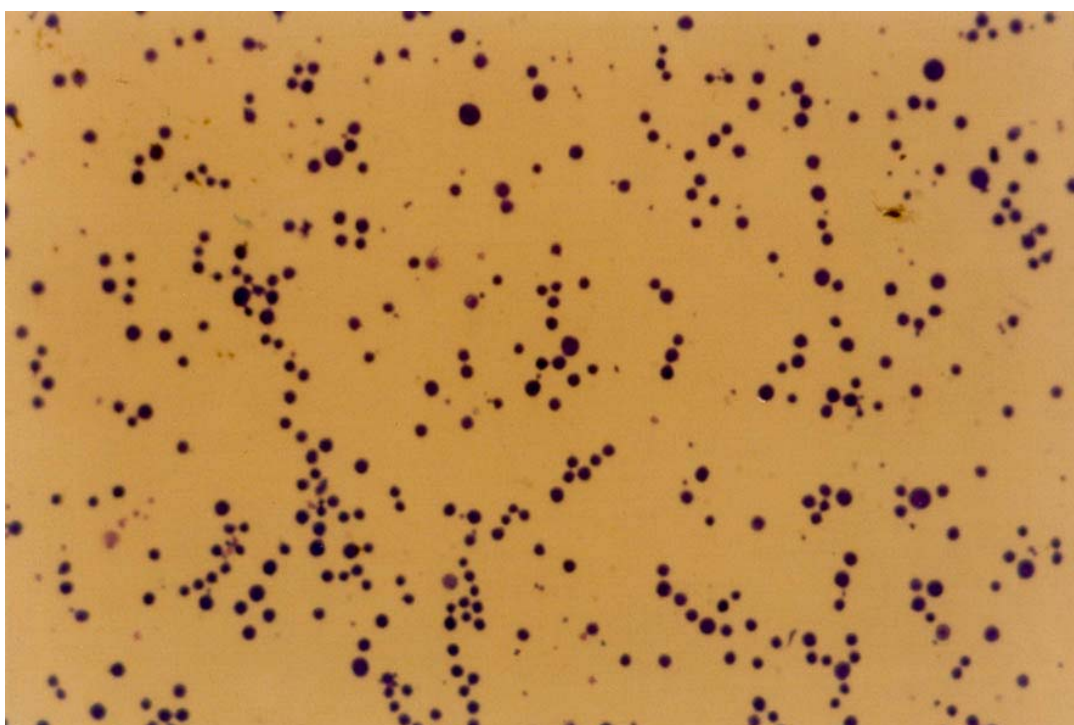


Microscópio Olympus Bx600, Objetiva 20x; filtro verde; tempo de exposição: 31 segundos.
Figura 4. Imunofluorescência indireta em células clone C6/36, não infectadas.



Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 100x de imersão.

Figura 5. Células de sarcoma 180/TG, coloração giemsa.



Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 40x de imersão.

Figura 6. Células de sarcoma 180/TG, coloração giemsa.



Figura 7. Camundonga ascíte volumosa desenvolvido após 8 dias de inoculação intraperitoneal de 200 μ L de suspensão de células de sarcoma 180/TG.

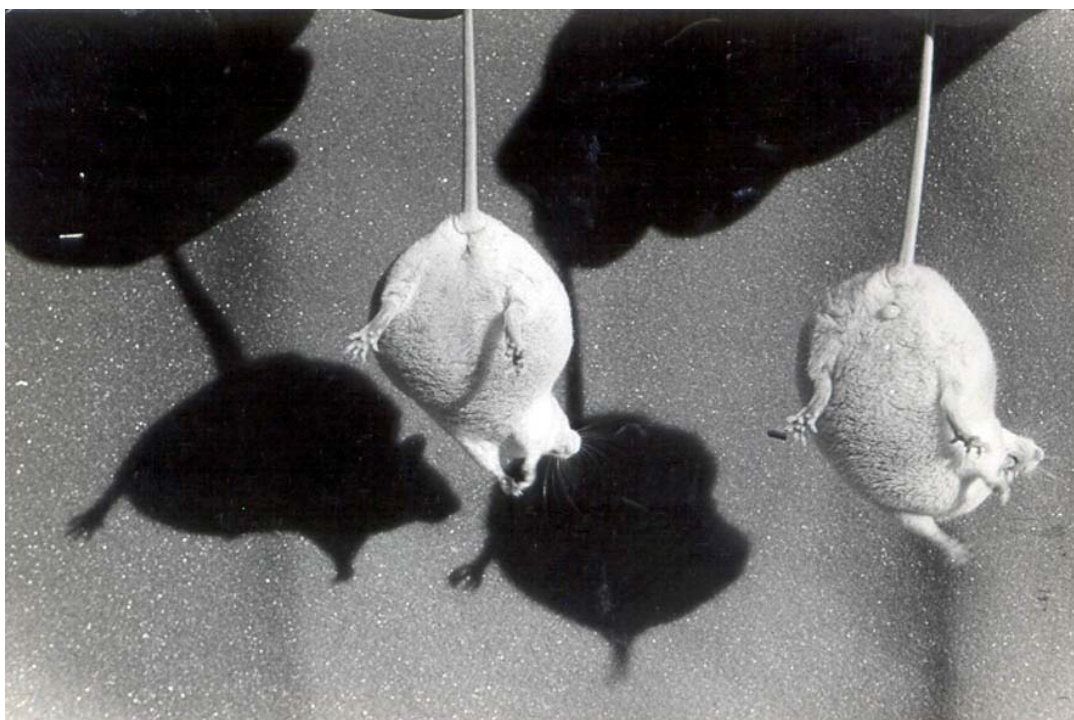
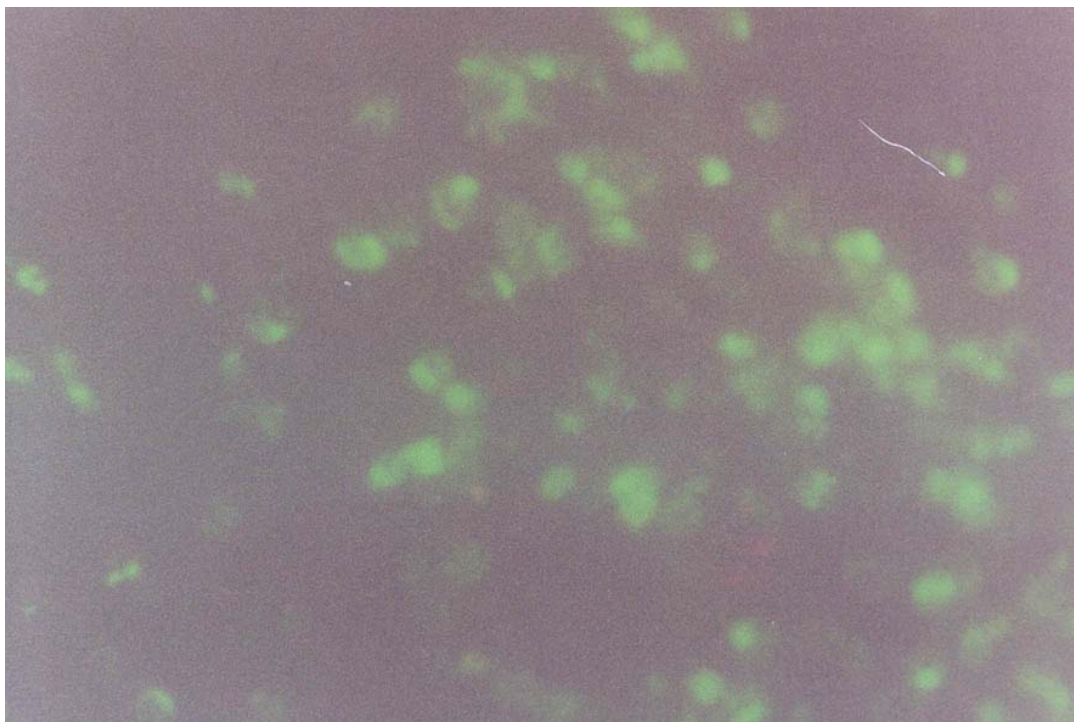
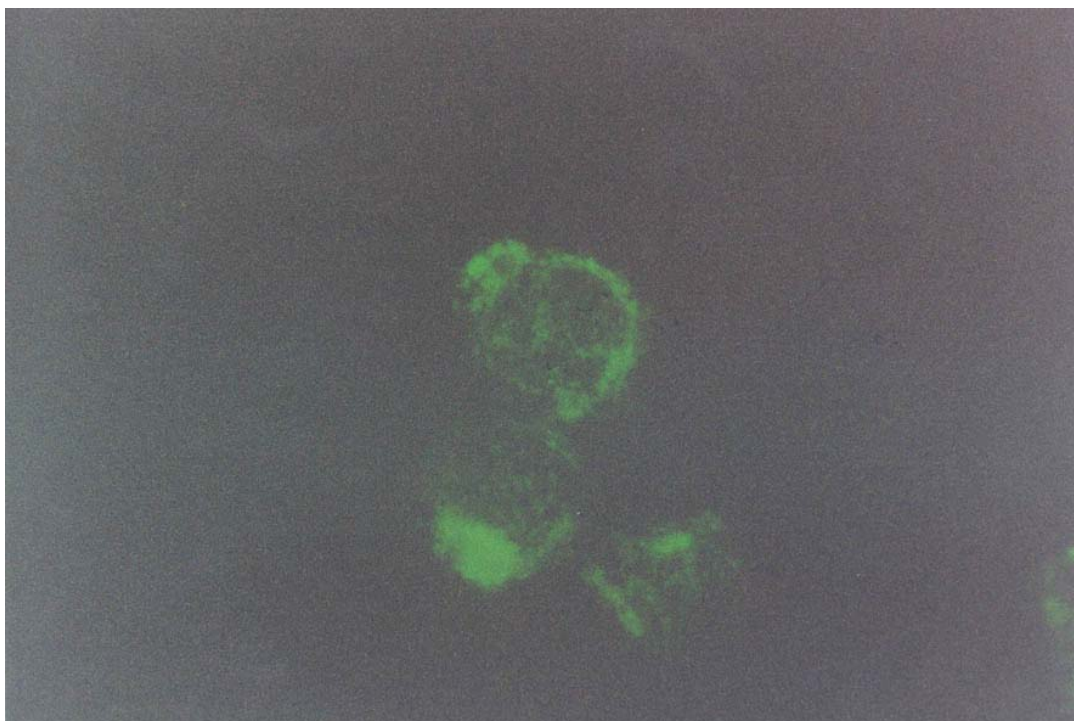


Figura 8. Camundongas com ascíte desenvolvida após 8 dias de inoculação intraperitoneal de 200 μ L de suspensão de células de sarcoma 180/TG.



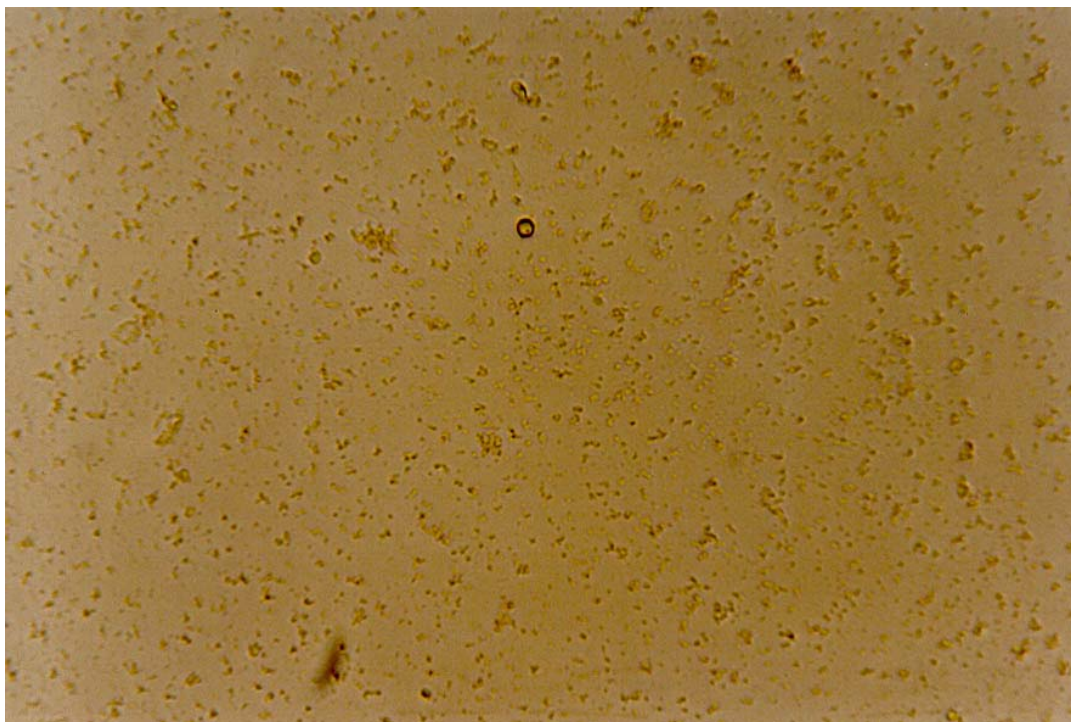
Microscópio Olympus Bx600, Objetiva 20x; filtro verde; tempo de exposição: 31 segundos.

Figura 9. Imunofluorescência indireta em células clone C6/36, infectados com DEN-1 *Moshizuki*.



Microscópio Olympus Bx600, Objetiva 1000x; filtro verde; tempo de exposição: 1,6 segundos.

Figura 10. Imunofluorescência indireta em células clone C6/36, infectados com DEN-1 *Moshizuki*.



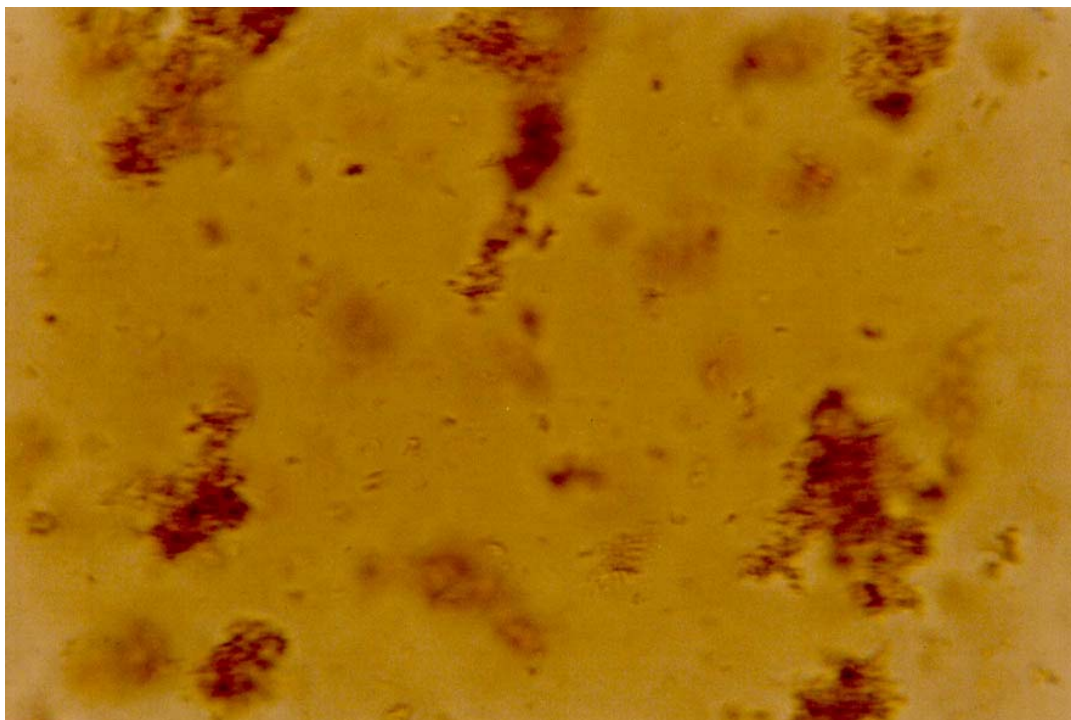
Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 100x.

Figura 11. Partículas de látex em suspensão com distribuição homogênea, pronta para uso.



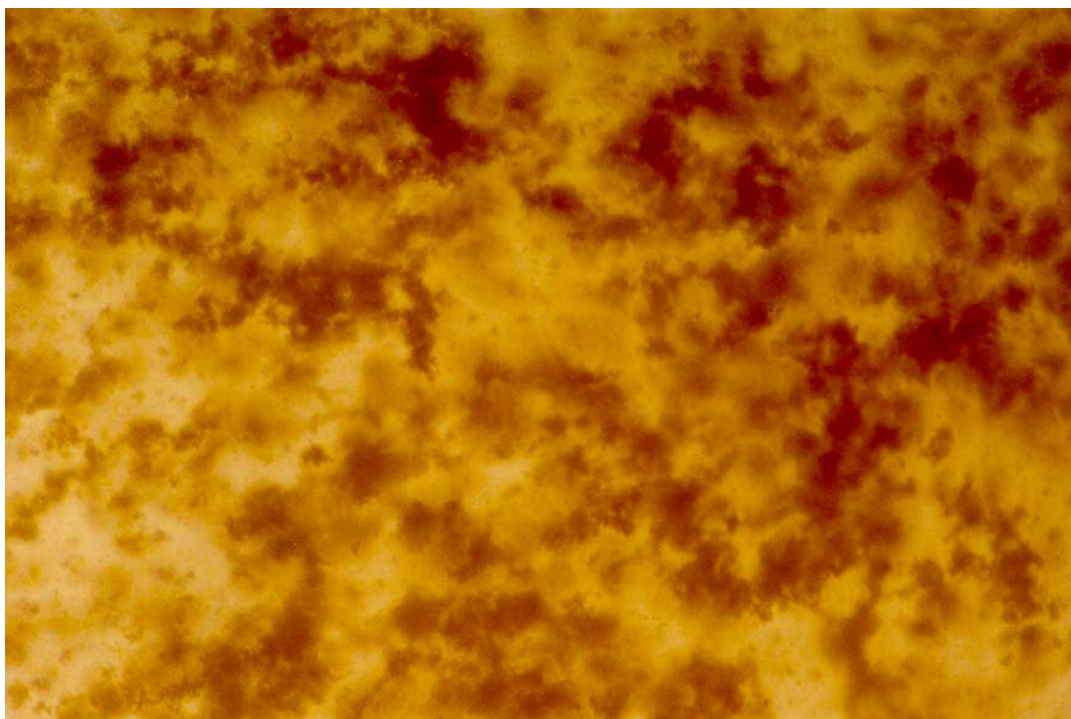
Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 4x.

Figura 12. Borda da gota (40µl) de suspensão de partícula de látex pronta para uso.



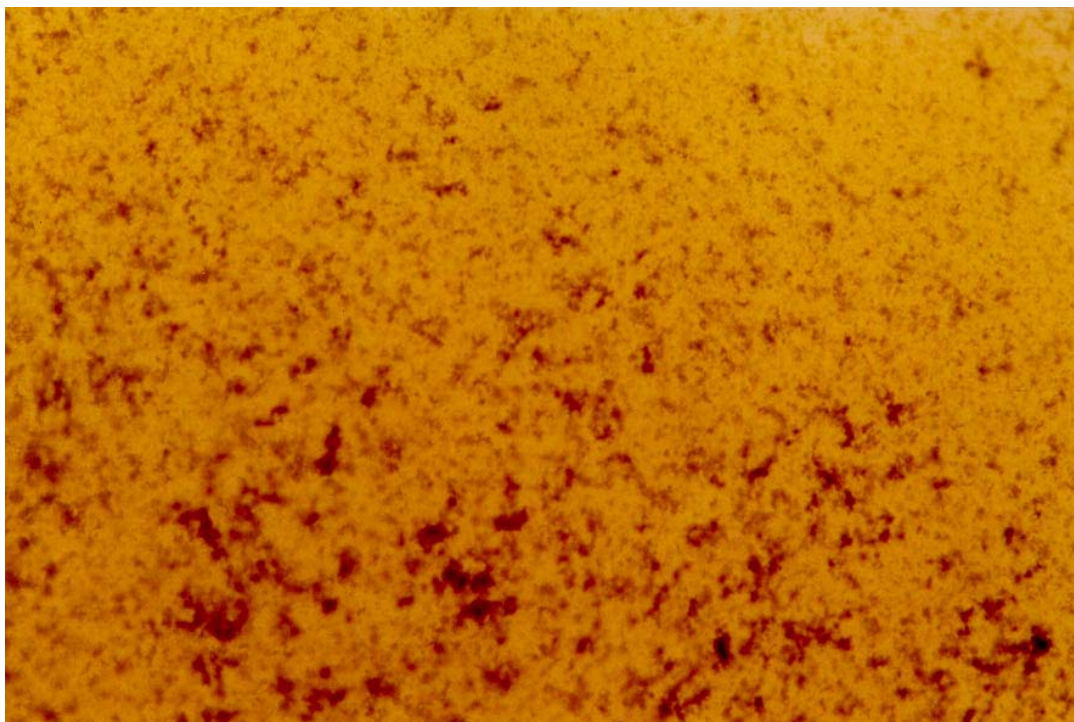
Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 100x de imersão.

Figura 13. Reação de aglutinação do látex positiva com grandes aglutinados.



Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 40x.

Figura 14. Reação de aglutinação do látex positiva com grandes aglutinados.



Microscópio Olympus Bx40, Objetiva 40x.

Figura 15. Reação de aglutinação do látex positiva.



Microscópio Nikon Eclipse E200, Objetiva 10x.

Figura 16. Reação com discreta aglutinação do látex, borda da gota de suspensão com pequenos aglutinados apenas na periferia.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

O teste de aglutinação do látex para diagnóstico da presença do vírus dengue 1 em amostras de fluído cerebral de camundongos Swiss, recém nascidos, infectados por via intracerebral com a cepa DEN-1 *Moshizuki*, desde que realizado sob rígida padronização de condições de reação, como solução tamponada com pH controlado em escala decimal, concentração determinada e homogeneidade das partículas de látex, mostrou-se alternativa de diagnóstico aos métodos tradicionalmente utilizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nobuchi H. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a chinese medical encyclopedia *Kampo Rinsho* 1979; 26:422-425.
2. Halstead SB. The XXth century dengue pandemic : need for surveillance and research. *Rapp Trimest Stat Sanit Mond*, 1992; 45:292-298.
3. Howe GM. A world geography of human diseases. Acad Press Inc: New York NY, 1977.
4. Gubler DJ. Dengue. In: Monath TP, Editor. *Epidemiology of arthropod - borne viral diseases* CRC. Press Inc Boca: Raton Fla, 1988. p. 223-260.
5. Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue / dengue haemorrhagic fever as a public health problem in the Americas *Infect Agents Dis* 1994; 2:383-393.
6. WHO. *Dengue haemorrhagic fever, diagnosis, treatment and control*. World Health Organization: Geneve – Switzerland, 1986.
7. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore*, 1999.

8. Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, Editors. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. CAB Intern London: United Kingdom, 1997. p. 1-22.
9. Ehrenkranz NJ, Ventura AK, Cuadrado RR, Pond WL, Porter JE. Pandemic dengue in Caribbean countries and the Southern United States. Past, present and potencial problems. N Engl J Med 1971; 285:1460-1469.
10. Rosen L. Observations on the epidemiology of dengue in Panama. Am J Hyg 1958; 68:45-68.
11. Downs WG. Immunity patterns produced by arthropod borne viruses in Caribbean area. Nat Inst Med Trop 1959; 16:88-100.
12. Pinheiro FP. Dengue in the Americas, 1980-1987. Epidemiol Bull 1989; 10:1-11.
13. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. PR Health Sci J 1987; 6:107-111.
14. Schatzmayer HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(supl. 1).

15. Gubler DJ, Clark GG. Dengue / dengue haemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995; 1:55-57.
16. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91:2395-2400.
17. Osanay CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos ADC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev Ist Med Trop S Paulo* 1983; 25:53-54.
18. Figueiredo LTM. Os Arbovírus do Brasil. *Anais de Segunda Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Sessão III – Virologia São Paulo, 16 de Agosto de 1994. p.45-58.*
19. FUNASA – Fund Nac de Saúde. Distribuição de casos confirmados, por unidade da Federação. Brasil 1980 – 2000. Abril, 2003.
20. PAHO – Pan Am Health Org. Number of reported cases of dengue and dengue haemorrhagic fever by country; 2004.
21. Duarte HHPD, França EB. Qualidade dos dados de vigilância epidemiológica da dengue em Belo Horizonte. *Rev Saúde Publ* 2006; 40:12-17.
22. SVS – Secr Vig em Saúde. Dengue Boletim da Semana 24/2005.

23. BEPA – Bol Epid Paulista. Dengue: atividades desenvolvidas na área de controle de vetores. Sup Contr Endem – Secr Est Saúde Agosto 2005. Ano 2; 20.
24. Pinheiro FP. Situação das arboviroses na região amazônica. International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers Belem April 1980; 14-18. Acad Bras Cienc Rio de Janeiro 1982; 27-48.
25. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Degallier N, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazon. J Braz Assoc Advanc Cienc 1992; 44: 117-124.
26. Rehle TM. Classification, distribution and importance of arboviroses. Trop Med Parasit 1989; 40:391-399.
27. Calisher CH, Brandt WE, Casals J, Shope RE, Tesh RB, Wiebe ME. Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I Togaviridae Alphaviridae Intervir 1980; 14:229-232.
28. Karabatsos N. General characteristics and antigenic relationships, in St. Louis Encephalitis Washington DC. Am Pub Health Assoc 1980; 40:105-158.

29. Degallier N, Hrve JP, Rosa PAP, Vasconcelos PFC, Rosa JFST, Sa Filho GC. A Ecologia dos Arbovírus na Amazonia: pesquisas atuais e perspectivas. *Hiléia Médica* 1987; 8:1-98.
30. Pinheiro FP. Situação das Arboviroses na região amazônica. In: *International Symposium on Tropical Arbovirosis and Haemorrhagic Fever Belem 1980 Acad Bras de Cienc* 1982; 8:27-48.
31. Collet MS, Anderson DK, Retzel E. Comparisions of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flavivirus. *J Gen Virol* 1988; 69:2637-2643.
32. Choo QL, Kuo G, Weiner A, Overby LR, Brandley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A non B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-362.
33. Calisher CH, Karabastos N, Darlymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Brasdt WE. Antigenic relationships betwen flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989; 70:37-43.
34. Figueiredo LTM. Aspects of dengue: Virology, History, Phisiopathology and Control. *Med Rib Preto* 1991; 24:111-121.
35. Rehle TM. Classification, distribution and importance of arboviroses. *Trop Med Parasit* 1989; 40:391-399.

36. Trent DW, Naeve CW. Biochemistry and replication In: St Louis Encephalitis Monath TP: Washington DC Am Pub Health; 1980. p. 159-199.
37. Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res* 1986; 31:103-168.
38. Rice CM, Strauss EG, Strauss JH. Structure of the flavivirus genome. In: Schlesinger S, Schlesinger M. *The togaviridae and flaviviridae*. New York, Plenum Press 1986 p 279-327.
39. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Inf Dis* 2002; 2: 33-42
40. Sabin AB. Research on dengue during world war II. *Am J Trop Med Hyg* 1952; 1:30-50.
41. Vezza AC, Rosen L, Repik P, Dalrymple J, Bisshop DHL. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:643-652.
42. Westway EG, Briton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaarainen L, *et al.* *Flaviviridae*. *Intervir* 1985; 24:183-192.
43. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever – a public health problem and a field for research. *Bull WHO* 1980; 58:1-21.

44. Hwang KP, Chu PY, Tung YC, Wang HL, Yueh YY, Chin C, *et al.* Molecular epidemiological study of dengue viruses type 1 in Taiwan. *J Med Virol* 2003; 70:400-409.
45. Halstead SB. Dengue. *Curr Opin Inf Dis* 2002; 15:471-476.
46. Halstead SB, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanaraaj S. Dengue haemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Inf Dis* 2002; 12:1474-1479.
47. Reiter P, Gubler DJ. Surveillance and control of urban dengue vectors. In: Gubler DJ and Kuno G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Cab Internat: London United Kingdom; 1997. p. 425-462.
48. Gubler DJ. Arboviruses as imported disease agents: the need for increased awareness. *Arch Virol* 1996; 11:21-32.
49. Rigau Perez JG, Vorndam AV, Clark GG. Dengue surveillance – United States 1986-1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1994; 43(SS-2) 7- 19.
50. Brandt WE, Buesher EL, Hetrick FM. Production and characterization of Arbovirus antibody in mouse ascitic fluid. *Am J Trop Med Hyg* 1967; 16:339-347.

51. Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever in The Americas Puerto Rico. *Health Sci J* 1987; 6:107-111.
52. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science* 1988; 239:476-481.
53. Gubler DJ. Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever in Americas: Prospects for the year 2000. In: Halstead SB, Dantes G, Editors. *Dengue: A Worldwide Problem, A Common Strategy* Ed by SB Halstead & Gomes - Dantes; 1992. p. 19-27.
54. Sabin A. Research on dengue during world war II. *Am J Trop Med Hyg* 1952; 1:30-50.
55. Figueiredo LTM. Estudo sobre o dengue em Ribeirão Preto no período de 1990 a 1993. [Tese de Livre Docência]. Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto; 1993.
56. Rosen I. The Emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26: 337-343.
57. Eckels KH, Kliks SC, Dubois DR, Wahl LM, Bancroft WH. The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue 2 live virus vaccine. *J Immunol* 1985; 135:4201-4205.

58. Vaughn DW. Dengue lessons from Cuba. *Am J Epidem* 2000; 152(9):800-803.
59. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V. Effects of antibodies on American dengue 2 infection and dengue haemorrhagic fever. *Lanc* 2002; 360:310-312.
60. Simmons JS, St John JH, Reynolds FHK. Experimental studies of dengue. *Philippine J Sci* 1931; 44:1-125.
61. Sangkhawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salituh V. Risk factors in dengue shock syndrome. A prospective epidemiological study in Rayong Thailand. *Am J Epidem* 1984; 120:653-669.
62. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE. A prospective study of dengue infection in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:172-180.
63. Singer JM, Plotz CM. The Latex fixation test. *Am J Med* 1956; 68:888-892.
64. FUNASA – Fund Nac de Saude. Dengue diagnostico e manejo clínico Min Saude . Dezembro; 2002.
65. Karabastsos N. International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3^a ed. San Antonio Tex: Am Soc Trop Med Hyg; 1985. p. 1147.

66. Rosen L, Gubler DJ. Use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23:1153-1155.
67. Kuberski TT, Rosen L. A simple method for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26:533-537.
68. Sinarachatanant P, Olson LC. Replication of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* cell cultures. *J Virol* 1973; 12:275-283.
69. Kuno G. Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum - free medium. *J Clin Microbiol* 1982; 16:651-855.
70. Figueiredo LTM. Uso de Células de *Aedes Albopictus* C6/36 na propagação e classificação de Arbovírus das Famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; 23(1):13-18.
71. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978; 40:531- 544.
72. Henchal EA, Mccown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:164-169.

73. Chandler LJ, Blair CD, Beaty BJ. Detection of dengue 2 viral RNA by reversible target capture hybridization. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2641-2647.
74. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase- polimerase chain reaction *J Clin Micr* 1992; 30:545-551.
75. Morita K, Maemoto T, Honda S, Onishi K, Murata M, Tanaka M, *et al.* Rapid detection virus genome from imported dengue fever and haemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reation. *J Med virol* 1994; 44:54-58.
76. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination – inhibition with arthropod – borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7:551-557.
77. Russel PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol* 1967; 99:291-296.
78. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Brandt WE. Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross – neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989; 70:37-43.
79. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM Immune complexes using an enzyme linked immunosorbent assay. *Am Trop Med Hyg* 1987; 36:153-159.

80. Race M, Williams MC, Agostini CG. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73:18-22.
81. Singer JM. The Latex fixation test in Rheumatic diseases. A review. *Am J Med* 1961; 31:766-779.
82. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Trop Med Hyg* 1938; 27:493-497.
83. Innis BL, Eckels KH. Progress in development of a live – attenuated tetravalent dengue vírus vaccine by the United States Army Medical Research and Material Command. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69;1-4.
84. Young E. Dengue may stay one step ahead. *New Scie* 2003;1:78-83.
85. Bricks LF. A vacina para a dengue. *Ped S Paulo* 2004; 26(4)268-281.
86. Pontes RJS, Netto AR. Vigilância e busca ativa de casos suspeitos de dengue hemorrágica em Ribeirão Preto, São Paulo. *Rev Panam Sal Publ* 1997; 1(3):58-61.
87. Cabos M, Gutierrez V, Garcia M, Mamoni E, Fernandez R, Rimarachin R, *et al*. Estudio serologico y viologico del brote de dengue em la provincia de

- coronel Portillo, Peru (2000-2001). *Rev Peru Méd Exp Salud Publ*, 2004; 21(3).
88. Rodrigues MBP, Freire HBM, Correa PRL, Mendonça ML, Silva MRI, França EB. É possível identificar a dengue em crianças a partir do critério de caso suspeito preconizado pelo Ministério da Saúde? *J Ped* 2005; 81(3): 209-215.
89. Garcia S, Herrera R, Solis R, Jaramillo A, Berro O, Urquiza HD. Evolucion del desenpeno del UMELISA dengue IgM em el diagnostico de dengue. Centro de Imunoensaios de Cuba; Escuela Colombiana de Medicina; Laboratorio Central Instituto Noel Nutels, Brasil (1996). Relatório.
90. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses clinical samples by using reverse transcriptase - polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 3:545-551.
91. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação de controle de doenças transmitidas por vetores. Manual de dengue – vigilância epidemiológica e atenção ao doente. Segunda edição. DEOPE: Brasília; 1996.
92. Marzochi KFB. Dengue epidêmico: o desafio das estratégias de vigilância *Rev Soc Bras Med Tro* 2004; 37(5):413-415.

93. Da Rosa APAT, Da Rosa EST, Da Rosa JFST, Degallier N, Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, *et al.* Os Arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos, Técnicas de Estudo Documento técnico n 2 Inst Evandro Chagas - Minist da Saude - BR.

94. Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. Bull WHO 1981; 59 (4): 623-630.