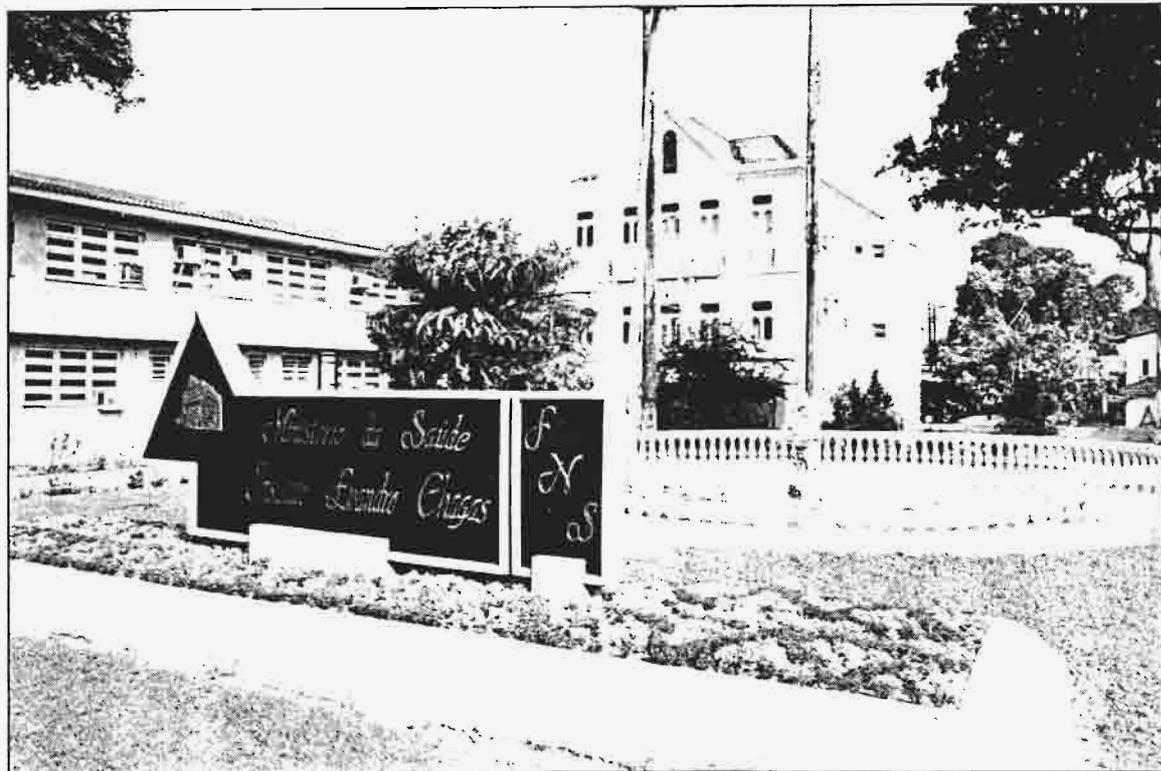


# Os Arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo

Documento Técnico nº 2  
Instituto Evandro Chagas  
Fundação Nacional de Saúde  
Ministério da Saúde



Amélia P. A. TRAVASSOS DA ROSA, Elizabeth S. TRAVASSOS DA ROSA,  
Jorge F. S. TRAVASSOS DA ROSA, Nicolas DÉGALLIER,  
Pedro F. C. VASCONCELOS e Sueli G. RODRIGUES

Serviço de Arbovírus  
Instituto Evandro Chagas  
Fundação Nacional de Saúde  
Ministério da Saúde  
Brasília - País - Brasil

# **OS ARBOVÍRUS NO BRASIL: GENERALIDADES, MÉTODOS E TÉCNICAS DE ESTUDO**

**Amélia P. A. TRAVASSOS DA ROSA, Elizabeth S. TRAVASSOS DA ROSA,  
Jorge F. S. TRAVASSOS DA ROSA, Nicolas DÉGALLIER,  
Pedro F. C. VASCONCELOS e Sueli G. RODRIGUES**

**SERVIÇO DE ARBOVÍRUS  
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS  
FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE  
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Belém, Pará, Brasil.**

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução e generalidades.....  | 1  |
| 2. Coleta, rotulagem e conservação das amostras.....  | 2  |
| 2. 1. Coleta das amostras.....  | 2  |
| 2. 1. 1. Hospedeiros vertebrados (homem incluído).....  | 2  |
| 2. 1. 1. 1. Sangue.....   | 2  |
| 2. 1. 1. 2. Vísceras e órgãos.....  | 2  |
| 2. 1. 2. Hospedeiros invertebrados (insetos ou ácaros hematófagos).....   | 2  |
| 2. 2. Rotulagem das amostras.....   | 2  |
| 2. 3. Conservação das amostras.....   | 3  |
| 2. 3. 1. Conservação no campo e transporte.....   | 3  |
| 2. 3. 2. Conservação no laboratório.....  | 3  |
| 3. Estudos virológicos (fig. 3).....  | 3  |
| 3. 1. Isolamento de vírus a partir de vertebrados (homem incluído) e invertebrados (insetos e ácaros).....                    | 3  |
| 3. 1. 1. Inoculação em camundongos recém-nascidos.....  | 3  |
| 3. 1. 2. Inoculação em culturas celulares.....  | 3  |
| 3. 1. 2. 1. Culturas celulares de vertebrados.....  | 3  |
| 3. 1. 2. 2. Culturas celulares de insetos (mosquitos).....  | 4  |
| 3. 2. Identificação.....  | 4  |
| 3. 3. Detecção de antígenos virais.....   | 4  |
| 3. 3. 1. Imunofluorescência.....  | 4  |
| 3. 3. 2. Imunohistoquímica.....   | 4  |
| 3. 3. 3. Hibridização "in situ".....  | 4  |
| 3. 3. 4. Reação de polimerização em cadeia (PCR).....   | 4  |
| 4. Testes sorológicos para detecção de anticorpos (fig. 3).....   | 4  |
| 4. 1. Inibição da hemaglutinação (IH).....  | 5  |
| 4. 2. Fixação do complemento (FC).....  | 5  |
| 4. 3. Soro-neutralização (TN, SN ou N).....   | 5  |
| 4. 4. Mac ELISA (detecção de IgM).....  | 6  |
| 4. 5. ELISA sobre culturas celulares para detecção de anticorpos IgG e IgM simultaneamente.....                               | 6  |
| 4. 6. Imunofluorescência (IF).....  | 6  |
| 5. Estudos eco-epidemiológicos.....   | 6  |
| 5. 1. Estudos entomológicos.....  | 7  |
| 5. 2. Diagnóstico clínico.....  | 7  |
| 5. 3. Interpretação dos dados viro-, soro-, clínico- e entomológicos.....   | 7  |
| 5. 3. 1. Interpretação dos dados virológicos (isolamentos).....   | 7  |
| 5. 3. 2. Interpretação dos dados sorológicos (detecção de anticorpos).....  | 7  |
| 5. 3. 3. Interpretação dos dados clínicos (diagnóstico da doença).....  | 8  |
| 5. 3. 4. Interpretação dos dados entomológicos.....   | 8  |
| 6. Elaboração de projetos de pesquisa.....  | 8  |
| Anexo 1. Materiais e procedimentos para tentativas de isolamento de arbovírus.....  | 9  |
| Anexo 2. Materiais e procedimentos para realização do teste de fixação do complemento (FC).....                               | 11 |
| Anexo 3. Materiais e procedimentos para realização do teste de imunofluorescência (IF).....                                   | 12 |
| Anexo 4. Materiais e procedimentos para realização do teste de inibição da hemaglutinação (IH).....                           | 14 |
| Anexo 5. Materiais e procedimentos para realização do MAC-ELISA.....  | 17 |
| Anexo 6. Materiais e procedimentos para realização do teste de neutralização (TN, N ou SN) em camundongos recém-nascidos..... | 19 |
| Anexo 7. Materiais e procedimentos para preparação de insumos básicos, reativos e soluções.....                               | 21 |

# OS ARBOVÍRUS NO BRASIL: GENERALIDADES, MÉTODOS E TÉCNICAS DE ESTUDO\*

por Amélia P. A. TRAVASSOS DA ROSA <sup>(1)</sup>, Elizabeth S. TRAVASSOS DA ROSA <sup>(1)</sup>  
Jorge F. S. TRAVASSOS DA ROSA <sup>(1)</sup>, Nicolas DÉGALLIER <sup>(2)</sup>,  
Pedro F. C. VASCONCELOS <sup>(1)</sup> e Sueli G. RODRIGUES <sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Virologista FNS, Instituto Evandro Chagas C.P. 1128 66090-000 Belém Pará  
Fone: (091) 228 10 22 / Fax: (091) 226 12 84

<sup>(2)</sup> Entomologista ORSTOM, C.P. 75 66017-970 Belém Pará  
e Instituto Evandro Chagas

## 1. Introdução e generalidades

Vários manuais, editados por instituições nacionais, ligadas ou não ao Ministério da Saúde, ou internacionais (PAHO, WHO), trataram da Febre amarela, do Dengue, hemorrágico ou não ou, dos seus vetores (Febre amarela - Manual de instruções para coleta de material destinado ao diagnóstico de laboratório, reedição 1985 MS-SUCAM, Brasília; Combate ao *Aedes aegypti* - Instruções para guardas, guardas-chefes e inspetores, SUCAM, MS, Brasília, 1985; Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control, WHO, Geneva, 1986; Manual de Dengue - Plano geral de ação integrada de combate ao dengue e prevenção da reurbanização da febre amarela no Estado do Rio de Janeiro, Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro, Departamento Geral de Epidemiologia, 1988).

Embora concisos sobre os assuntos abordados, esses manuais tratam superficialmente dos ensaios laboratoriais seguidos nas pesquisas sobre esses arbovírus.

O presente trabalho, além de ser "mais um manual", foi elaborado para preencher essa lacuna, divulgando a experiência acumulada pelo Serviço de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas - FNS (Centro de Referência Nacional para Arboviroses e Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde - OMS - em Arboviroses) du-

rante 40 anos de pesquisas sobre esses agentes. Neste, serão abordados afora a coleta das amostras e sua conservação, as técnicas virológicas, sorológicas, entomológicas e epidemiológicas, que são utilizadas rotineiramente pelo IEC.

Os Arbovírus são vírus transmitidos biologicamente por insetos (e outros artrópodes) entre vertebrados. Tanto no inseto como no hospedeiro vertebrado, eles têm ciclos de multiplicação.

Entre os 535 arbovírus registrados por Karabatsos (1985: *International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*, 3rd ed., American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas: 1147 p.), 120 já foram encontrados no Brasil. Outrossim, em torno de 70 vírus novos para o mundo foram isolados mas, ainda não registrados. Entre eles 34 são patógenos para o homem, sendo que mais ou menos 10 podem causar epidemias. Embora a região amazônica represente a maior fonte de infecção por vários arbovírus endêmicos, as outras regiões do Brasil não são indenes e epidemias urbanas, especialmente causadas pelos vírus Dengue, Febre amarela, febre do Oropouche, Rocio e outros vírus causadores de encefalites, constituem um risco de saúde para uma parcela importante da população.

\* Trabalho realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições: ORSTOM (France), Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde & CNPq (Brasil).

## 2. Coleta, rotulagem e conservação das amostras

### 2. 1. Coleta das amostras

Quaisquer que sejam os testes a serem realizados com as amostras, os cuidados com assepsia são essenciais, tanto para evitar **contaminação acidental do laboratorista**, como **contaminação do material**, inviabilizando a sua conservação, prejudicando portanto, os estudos projetados.

A prevenção das contaminações é feita através do uso de materiais (luvas, seringas e agulhas) descartáveis e, de uma esterilização adequada da vidraria e materiais metálicos (tesouras, pinças, etc.), por autoclavagem.

É indispensável controlar o estado de proteção imunitária do pessoal envolvido, contra febre amarela, raiva, hepatite B e outras doenças que podem ser contraídas através do contato com doentes ou animais silvestres.

Precauções devem também ser tomadas para estocar as amostras com a maior rapidez. Assim, indicaremos as **durações e temperaturas máximas** de conservação para cada tipo de material.

#### 2. 1. 1. Hospedeiros vertebrados (homem incluído)

##### 2. 1. 1. 1. Sangue

Ao ser colhido, o sangue deve ser imediatamente alíquotado em duas partes: uma para tentativa de isolamento de vírus e outra, para estudos sorológicos.

Para tentativa de isolamento, apenas 0,5 - 1 ml de sangue é suficiente. Se o material for colhido no laboratório onde será processado (= inoculado), pode ser mantido a 4° C no máximo por 6 h. Nos outros casos, ele **deve** ser conservado (sem limitação de tempo) no freezer a - 70° C ou no nitrogênio líquido (ou eventualmente no gelo seco).

Se a coleta for realizada *post-mortem*, o sangue deve ser puncionado diretamente do coração.

Para estudos sorológicos, quantidades superiores de sangue devem ser recolhidas e deixadas em repouso até retração e separação do coágulo. O soro obtido é decantado ou aspirado com pipeta Pasteur, e conservado a 4° C ou - 20° C, caso os testes sejam realizados imediatamente ou não, respectivamente.

##### 2. 1. 1. 2. Visceras e órgãos

Como os arbovírus possuem tropismos para vários órgãos, as vísceras são também excelentes fontes de isolamentos. No caso de óbito humano e de animais domésticos ou silvestres, um frag-

mento (1 cm) dos seguintes órgãos devem ser obtidos e conservados em ultra baixa temperatura (no nitrogênio líquido ou a - 70° C):

- a) cérebro: tubo separado;
- b) coração, baço, fígado, rins: um só tubo ("pool" de vísceras);
- c) glandulas salivares, no caso de morcegos: tubo separado.

O tempo de preservação dos arbovírus nos tecidos de um animal morto é variável, no entanto, quanto menor for o intervalo entre a coleta e a crioconservação ou inoculação (tempo que nunca deveria ultrapassar 6 h), melhor serão as condições para isolamento viral.

É também muito proveitoso fixar amostras dos mesmos órgãos no formol, para estudos posteriores de histopatologia.

#### 2. 1. 2. Hospedeiros invertebrados (insetos ou ácaros hematófagos)

Os invertebrados destinados às tentativas de isolamento de arbovírus devem ser coletados vivos, usando isca humana ou animal, ou ainda armadilhas, dentro de seus ambientes naturais.

A técnica, o local e horário de coleta devem ser compatíveis com os hábitos e a biologia dos insetos procurados. Os mosquitos de hábitos crepuscular e noturno podem ser coletados com armadilhas luminosas. A tabela 1, mostra quais são os locais, horários, materiais e iscas a escolher, para coleta dos vetores da Dengue e da Febre amarela no Brasil.

Os insetos adultos assim coletados são transferidos para tubos de vidro e em seguida anestesiados a frio (Fig. 1), pouco antes de serem colocados nos tubos usados para transporte ou estocagem.

No laboratório, é também a frio, sobre uma mesa refrigerada a -20°C (construída localmente), que os mosquitos são identificados, e agrupados por espécies e por sexo antes de serem submetidos a pesquisa virológica.

#### 2. 2. Rotulagem das amostras

A rotulagem correta e completa é um **passo essencial** para uma pesquisa virológica confiável.

Com caneta ou lápis, indelével aos meios de conservação (nitrogênio, álcool, frio, etc...), têm que ser inscrito sobre o suporte (etiqueta, esparadrapo, etc...), pelo menos os seguintes dados:

- a) número de ordem;
- b) data da coleta: dia / mes / ano;
- c) local da coleta: lugar, aldeia, cidade, município, estado;

d) método de coleta: isca, horário, sangria, armadilha, etc...;

e) natureza da amostra: sangue, vísceras, mosquitos;

f) i) no caso de coleta de sangue humano para pesquisa de vírus ou para inquérito sorológico: preencher uma ficha epidemiológica completa (Tabela 2);

ii) no caso de inquérito entomológico, preencher uma ficha com condições meteorológicas, tipo de vegetação, intervenção eventual de atividades de combate, etc...

## 2. 3. Conservação das amostras

### 2. 3. 1. Conservação no campo e transporte

Para transporte de 6 h ou menos, é possível acondicionar vidros com soros, **destinados unicamente à análise sorológica**, em gelo seco ou gelo de água, em caixa de isopor. Em outros casos, o nitrogênio líquido é indispensável.

Para transporte de material virológico (= destinado a tentativas de isolamento de arbovírus), é **indispensável** usar um **botijão criobiológico contendo nitrogênio líquido**. Os tubos devidamente rotulados, são lacrados com fita durex antes de serem colocados no nitrogênio.

### 2. 3. 2. Conservação no laboratório

Quando o objetivo é **conservar o vírus** ou material suspeito, a temperatura **máxima** deve ser igual a - 70°C.

Quando se trata de conservar soros com **anticorpos**, a temperatura **máxima** deve ser igual a - 20° C.

No que concerne aos estudos entomológicos, as temperaturas ideais de conservação do material no campo e no laboratório estão indicadas na fig. 2.

## 3. Estudos virológicos (fig. 3)

O isolamento do agente é o método ideal para determinação do arbovírus específico responsável pela infecção ou doença.

### 3. 1. Isolamento de vírus a partir de vertebrados (homem incluído) e invertebrados (insetos e ácaros)

As amostras de sangue e seus derivados são inoculadas sem diluição e diluídas 1:10 em solução fosfatada - tamponada (pH 7,2), contendo albumina bovina a 0,75 % e antibióticos (penicilina e estreptomycin). Os fragmentos de vísceras são triturados, suspensos a 10 % no diluente aci-

ma, e a seguir, centrifugados a 2000 rpm durante dez minutos.

Lotes de 10 - 30 artrópodes da mesma espécie são triturados, suspensos em albumina bovina e logo centrifugados.

### 3. 1. 1. Inoculação em camundongos recém-nascidos

Os camundongos brancos Swiss são usados extensivamente no isolamento de arbovírus, certos enterovírus, Raiva, Herpes, etc. A idade dos camundongos tem uma grande influência sobre sua susceptibilidade à doença. Para a maioria dos arbovírus, camundongos de 2 - 3 dias constituem a melhor fonte.

Os camundongos podem ser inoculados por várias vias, dependendo do espécimen e do vírus suspeito. As diferentes vias de inoculação em camundongos são: intracerebral (ic), intraperitoneal (ip), subcutânea (sc) e intramuscular (im).

Após inoculação, os animais são observados diariamente, durante duas a três semanas. Dos que mostram sinais de doença, retira-se o cérebro e/ou fígado para novas passagens, ou para a realização de provas sorológicas (ver anexo 1: § 1).

### 3. 1. 2. Inoculação em culturas celulares

Não existe um sistema universal de cultivo celular para isolamento de arbovírus. No entanto, muitos arbovírus podem crescer sem e com produção de efeito citopatogênico (ECP), placas ou ambos, em diversas culturas celulares (ver anexo 1: § 2).

#### 3. 1. 2. 1. Culturas celulares de vertebrados

Entre as linhagens contínuas de maior aplicação destacam-se: VERO ("African Green Monkey"), BHK-21 ("Baby Hamster Kidney"), LLC-MK2 ("Rhesus Monkey Kidney").

A linhagem VERO é mantida em estufa a 35 - 37° C. A tripsinização é feita de 7 em 7 dias. Recomenda-se a troca do meio entre 2 tripsinizações. Nesse processo usa-se solução de tripsina acrescida de EDTA. Em qualquer tipo celular, dois a três tubos são inoculados com cada material, e observados microscopicamente (60 x) de dois em dois dias, para detecção de efeito citopatogênico. Os fluidos positivos são colhidos para novas passagens ou para as provas de identificação (ver anexo 1: § 2. 2. 2.).

### 3. 1. 2. 2. Culturas celulares de insetos (mosquitos)

Recentemente, o uso das culturas celulares de mosquitos têm mostrado grande sensibilidade para isolamento de inúmeros arbovírus, dentre os quais, febre amarela e dengue. Existem, atualmente, três tipos celulares de maior uso em laboratório e que são: *Aedes pseudoscutellaris* (AP 61), *Aedes albopictus* (clone C6/36) e *Toxorhynchitesamboinensis* (TRA 284).

Essas culturas crescem à temperatura ambiente e podem ser levadas diretamente ao campo. Elas são mantidas em garrafas de 25 ml a temperatura ambiente (28° C), semeadas em 10 ml do meio de crescimento e repicadas de 8 em 8 dias. Há necessidade de lembrar que algumas amostras de dengue replicam em células de mosquitos sem produzir ECP na primeira passagem. O dengue 4, por exemplo, possui um efeito muito discreto, capaz de passar despercebido a uma pessoa com pouca experiência (ver anexo 1: § 2. 2. 1.).

### 3. 2. Identificação

Uma vez isolado, o vírus deve então ser identificado.

Inicialmente, realiza-se uma identificação de grupo através do teste de fixação de complemento (FC), usando soros hiperimunes contra os grupos de vírus mais comuns na área sob estudo. A identificação precisa da espécie viral é feita com soros específicos. Suspensões a 16 % do cérebro e/ou fígado de camundongos suspeitos são usados como fonte de antígenos (ver anexo 2 e fig. 4).

Alternativamente, os testes de inibição da hemaglutinação (IH), neutralização (N) e imunofluorescência (IF) podem ser usados.

No que tange a IF dois métodos tem sido usados (fig. 5).

No método direto, as células infectadas fixadas na lâmina são cobertas com soro contendo imunoglobulinas antivirais marcadas com o isotiocianato de fluoresceína (conjugado) e havendo especificidade, a fluorescência é observada (ver anexo 3: § 3).

No método indireto, o uso de anticorpos monoclonais, é o método mais eficaz para identificar e caracterizar os isolamentos de Dengue, Febre amarela e alguns outros arbovírus. Este método é realizado em duas etapas em que:

- primeiramente, as células infectadas são fixadas na lâmina e, adicionado o anticorpo (imunoglobulina) específico;

- posteriormente, a antiimunoglobulina, marcada com isotiocianato de fluoresceína

(conjugado), é adicionada, formando-se o complexo fluorescente (Gubler *et al.*, *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1984, 33(1): 158-165) (ver anexo 3: § 4).

### 3. 3. Detecção de antígenos virais

#### 3. 3. 1. Imunofluorescência

A detecção de antígenos virais em peças (fragmentos de órgãos) criopreservadas pode ser feita através da técnica direta ou indireta.

As peças são colocadas na platina do criostato (a - 20° C) para obtenção dos cortes de 2 a 3 µm de espessura, que serão fixados por acetona gelada nas lâminas. Em seguida, procede-se como descrito acima para os métodos direto e indireto.

Lê-se ao microscópio de imunofluorescência (ver anexo 3: § 2).

#### 3. 3. 2. Imunohistoquímica

A presença de antígenos virais em cortes de tecidos humanos, fixados em formol e emblocados em parafina, tem sido demonstrada pela digestão com tripsina. Em seguida, cora-se usando uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase) marcada com anticorpo específico. Lê-se ao microscópio óptico. Essa técnica, deve ser adaptada à infecção viral suspeita, após diagnóstico histopatológico prévio.

#### 3. 3. 3. Hibridização "in situ"

Consiste na detecção de genomas virais específicos através o uso de sondas radioativas ou não radioativas, marcadas com radioisótopos ou enzimas, respectivamente. É uma técnica sensível que pode ser aplicada a materiais guardados por anos.

#### 3. 3. 4. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A reação de polimerização em cadeia é uma técnica que amplifica sequências específicas do RNA ou DNA viral, o que têm permitido detectar infecção em células mononucleares do sangue periférico, que contenham quantidades mínimas de ácido nucleico viral.

### 4. Testes sorológicos para detecção de anticorpos (fig. 3)

Os testes sorológicos complementam o isolamento do vírus ou quando isto não é possível, servem como meio alternativo de diagnóstico. Com efeito, numerosos casos de doenças por arbovírus, têm sido reconhecidos apenas baseados em testes sorológicos, embora o diagnóstico

específico, muitas vezes, fique prejudicado por respostas do tipo secundária. Esta resposta, depende se o indivíduo já havia sido exposto anteriormente a uma outra infecção por um outro agente pertencente ao mesmo grupo antigênico.

Os produtos e materiais necessários a realização destes testes, tais como os seus procedimentos são listados nos anexos 2 a 6.

#### 4. 1. Inibição da hemaglutinação (IH)

Este teste é recomendado para sorologia de rotina.

Trata-se de um teste sensível, de fácil execução e que requer equipamento muito simples. É ideal para estudos soroepidemiológicos, uma vez que os anticorpos IH, aparecem na primeira semana após o início da doença e persistem por um longo período de tempo (fig. 6).

Nesse teste, os soros ou plasmas são inicialmente tratados por acetona ou adsorvidos por kaolim, para remoção dos inibidores inespecíficos da hemaglutinação e, a seguir, adsorvidos por hemácias de ganso. São testados na diluição de 1:20 contra quatro unidades de antígeno e, em seguida, as amostras positivas são tituladas contra os antígenos que as inibem. A técnica de IH utilizada, é essencialmente, a descrita por Shope (*An. Microbiol.*, 1963, 11: 163-171) e Shope & Sather (1979: p. 792-801 *in* : "Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections", 5a ed. por E.H. Lennette & N.J. Schmidt, American Public Health Association, Inc., xix + 1138 p) (ver anexo 4 e fig. 7).

#### 4. 2. Fixação do complemento (FC)

Esta técnica, embora menos sensível, é mais específica que o IH.

Os anticorpos FC aparecem mais tardiamente (2 semanas após o início da doença) e podem persistir em títulos moderados ou altos por períodos prolongados (pelo menos 2 anos).

A principal desvantagem deste teste, é sua execução, a qual sem treinamento adequado de pessoal de laboratório, dificulta sua padronização e assim a obtenção de resultados confiáveis.

A técnica utilizada é a de Fulton & Dumbell (*J. gen. Microbiol.*, 1946, 3: 97-111). O teste fundamenta-se na capacidade do complemento participar na reação antígeno-anticorpo, sendo realizado em 2 fases (fig. 4). Na 1ª fase o soro suspeito é colocado para reagir com um antígeno conhecido na presença do complemento. Na 2ª fase o sistema revelador (glóbulos de carneiro + hemolisina) é adicionado. Se na 1ª etapa o com-

plemento foi consumido por uma reação antígeno-anticorpo, não sobra complemento livre e, quando processa-se a 2ª etapa, os glóbulos de carneiro não são lisados pela hemolisina (soro de coelho anti-glóbulos de carneiro) e sedimentam, formando um botão no fundo da placa. Nesse caso a reação é considerada positiva. Se ao contrário, o soro não possui anticorpos específicos ao vírus testado, o complemento permanece livre e, os glóbulos de carneiro são lisados. Nesse caso a reação é considerada negativa, não ocorrendo formação de botão e sim hemólise. Os procedimentos para realização do teste são detalhados no anexo 2.

#### 4. 3. Soro-neutralização (TN, SN ou N)

O teste de neutralização é um procedimento sorológico básico em virologia. Seu alto grau de especificidade imunológico o credencia como padrão, quando outros procedimentos sorológicos são avaliados.

A neutralização viral é definida como a perda de infectividade através da reação do vírus com o anticorpo específico. A formação de anticorpos humorais contra um determinado vírus, é o resultado de uma reação contra este vírus, seja por infecção natural ou imunização.

Anticorpos neutralizantes podem ser medidos por testes *in vivo* e *in vitro*, desde que um sistema de cultura de tecido suscetível seja obtido para este último. Dois procedimentos básicos são usados (fig. 8):

- Diluições seriadas do vírus e diluição constante do soro: este procedimento é mais usado em testes *in vivo*, e menos frequente em testes *in vitro*. É recomendado, principalmente, para uso com soros coletados recentemente ou para aqueles mantidos sob constante congelamento. As misturas vírus-soros são incubadas a 37° C para permitir o processamento da reação e, a seguir, inoculadas no hospedeiro suscetível.

Resultados do teste de neutralização usando o procedimento supra-citado, são expressos como índice de neutralização (ILN), log<sub>10</sub> ou um antilogaritmo. Um log IN de 1,7 é frequentemente aceito como limite mínimo para um resultado ser considerado positivo.

- Diluições seriadas do soro com uma quantidade constante de vírus: neste teste uma diluição selecionada do vírus (determinada por titulação prévia) é misturada com diluições variadas do soro incubada e inoculada no hospedeiro suscetível. Contudo, este teste apresenta sérias desvantagens na aplicação *in vivo*, uma vez, que apenas uma única diluição do vírus é empregada.

Isto, torna tecnicamente difícil trabalhar dentro da faixa estreita requerida no teste *in vivo*. É mais utilizado no sistema de cultura de tecidos (*in vitro*). A quantidade de vírus não deve ser excessiva, nem insuficiente.

Os resultados são expressos como àquela diluição do soro que protege 50 % dos animais ou culturas contra uma quantidade específica do vírus (LD<sub>50</sub> ou TCID<sub>50</sub>) ou, redução do número de placas por uma percentagem específica (90 %), quando um determinado número de unidades formadoras de placas (PFU) é usado.

Os anticorpos aparecem cedo (primeira semana de doença) e permanecem por muitos anos senão durante a vida toda.

Como se trata de técnica trabalhosa e dispendiosa, seu uso fica reservado, nos casos em que dúvidas existam quanto a especificidade dos anticorpos detectados pelos testes anteriormente citados, principalmente nos casos de respostas do tipo secundária (Shope & Sather, *op. cit.*: p. 801-803). Os procedimentos para realização do teste são descritos no anexo 6.

#### 4. 4. Mac ELISA (detecção de IgM)

O ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") vem sendo amplamente usado no diagnóstico viral por ser bastante sensível e não exigir equipamento especializado, além disso, quando utilizado para detecção de anticorpo não necessita de amostragem sérica pareada para a realização do diagnóstico.

Diagnóstico de infecção recente ou ativa pode ser feito através do método MAC-ELISA que demonstra a presença de anticorpos da classe IgM no soro do paciente, os quais já podem ser detectados

a partir do sexto dia após o início dos sintomas e perduram por cerca de 60-90 dias. Vale ressaltar que em caso de infecção secundária a produção de anticorpo IgM ocorre em baixos níveis, as vezes não detectáveis, neste caso é de fundamental importância a avaliação de outros testes, como por exemplo o IH.

O MAC ELISA é um ensaio de captura de IgM no soro suspeito, através de uma anti-IgM humana ligada à placa do teste, e após as diversas etapas do ensaio (fig. 9) a presença de anticorpos IgM no soro do paciente é demonstrada pela mudança de cor do substrato ao sofrer ação enzimática do conjugado, no caso da técnica utilizada para arbovírus o substrato inicialmente incolor torna-se verde azulado, a intensidade da cor está diretamente proporcional a quantidade de an-

ticorpos da classe IgM específicos contidos no soro. A leitura do teste é feita através de métodos colorimétricos (densidade óptica).

O diagnóstico de infecção recente para dengue, Febre amarela e Rocio é feito segundo o método descrito por Kuno *et al.* (1987, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 36(1): 153-159), e uma adaptação desta técnica é empregada para o diagnóstico de infecções pelos vírus Oropouche, Mayaro e VEE (ver anexo 5).

#### 4. 5. ELISA sobre culturas celulares para detecção de anticorpos IgG e IgM simultaneamente

Utiliza-se nesta técnica, culturas celulares do clone C6 / 36, infectadas com o objetivo de estudar a resposta imune, tendo sido utilizada, principalmente, em inquéritos sorológicos em grandes epidemias de dengue e febre amarela, objetivando detectar anticorpos específicos IgG e IgM. Resalte-se, que é uma técnica rápida, simples, econômica e confiável para o diagnóstico sorológico de infecções primárias e secundárias por diferentes subtipos de vírus do dengue, febre amarela e outros *Flavivirus* (Figueiredo & Shope, 1987, *J. virol. Methods.*, 17: 191-198).

#### 4. 6. Imunofluorescência (IF)

De considerável interesse prático, têm sido o uso da IF como teste diagnóstico de infecções ou mesmo em inquéritos soro-epidemiológicos.

Lâminas com múltiplas áreas (10-12) de células infectadas, fixadas, contendo antígenos, recebem o soro cujos anticorpos específicos, se fixarão aos antígenos virais, que, em seguida serão revelados com o uso de anticorpo marcado com isotiocianato de fluoresceína (conjugado), e, observados em microscópio imunofluorescência (luz ultravioleta).

#### 5. Estudos eco-epidemiológicos

A transmissão de arbovírus por insetos hematófagos, tanto em ciclos silvestres endêmicos ou epizóticos, como em ciclos urbanos epidêmicos, depende de numerosos fatores, ligados às condições ambientais e aos diferentes participantes desses ciclos.

Embora todos tenham que ser analisados conjuntamente numa determinada situação, os mais importantes são os fatores ligados aos vetores e os ligados ao hospedeiro vertebrado.

### 5. 1. Estudos entomológicos

Os fatores ligados aos vetores são os seguintes (por ordem decrescente de importância):

a) *densidade* : quer seja densidade de adultos, larvas ou ovos, é fundamental que seja estimada de maneira **padronizada**, para permitir **comparações** entre momentos e localidades diferentes; outrossim, é indispensável repetir as estimativas, de maneira a minimizar os efeitos da variabilidade da amostragem, geralmente enorme nesse caso; ela é função de múltiplos parâmetros entre os quais, a quantidade e repartição das chuvas, existência de criadouros (favorecidos pelas atividades humanas no caso da Dengue), eficácia das medidas de combate, etc...

b) *idade fisiológica* (das fêmeas): os mosquitos adultos, conservados no nitrogênio líquido ou no freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , podem servir ao mesmo tempo às tentativas de isolamento de vírus e à determinação da idade fisiológica; enquanto os torax e as cabeças são inoculados em camundongos, os abdomens são dissecados para determinação do estado paro (fêmeas paridas) ou nuliparo (fêmeas nulíparas); conhecendo a duração do ciclo viral extrínseco e a duração do ciclo gonotrófico do mosquito, é possível estimar o potencial vetorial da população de fêmeas.

c) duração do *ciclo gonotrófico* : é o tempo que separa dois repastos consecutivos de sangue pelas fêmeas do vetor. Ele varia com fatores climáticos. Em condições naturais, este intervalo pode ser avaliado, marcando com pó fluorescente mosquitos em busca de repasto sanguíneo, soltando-os, e recapturando-os diariamente durante duas a três semanas;

d) duração do *ciclo extrínseco* de multiplicação do vírus no mosquito: é o tempo necessário para que o vírus uma vez ingerido pelo mosquito, torne-se capaz de ser repassado a um novo hospedeiro. Esse tempo, determinado em laboratório, depende principalmente das amostras do vírus e do mosquito, e da temperatura;

Muitos outros aspectos do comportamento do mosquito podem ser estudados em relação a possíveis melhoramentos e diversificação dos meios de combate: resistência a inseticidas químicos, uso de inseticidas biológicos, uso de produtos repelentes, etc...

### 5. 2. Diagnóstico clínico

Embora a sintomatologia das doenças causadas por arbovírus não seja específica, no caso da Dengue, Febre amarela, Encefalites e outras síndromes como a febre do Oropouche, é necessário

recolher dados relativos ao quadro clínico. Assim, em caso de sintomas hemorrágicos ou nervosos, exames mais aprofundados devem ser realizados. Dados tanto clínicos como epidemiológicos são importantes para realizar-se uma interpretação correta dos resultados dos exames laboratoriais.

Na tabela 2 são enumerados os dados, cujo preenchimento é **indispensável** na ficha epidemiológica.

### 5. 3. Interpretação dos dados viro-, soro-, clínico- e entomológicos

#### 5. 3. 1. Interpretação dos dados virológicos (isolamentos)

A dificuldade é a eliminação de resultados falsos positivos e falsos negativos. Os primeiros são geralmente causados por contaminação durante o manejo dos camundongos ou das culturas celulares. Os segundos, de detecção mais difícil, são resultados de erros de dosagem de reativos, descongelamento acidental, contaminação exógena de culturas ou camundongos, canibalismo entre os últimos, etc...

Rotineiramente, deve-se conservar uma aliquota da amostra original, para realizar tentativas de **reisolamento** e titulação do agente.

#### 5. 3. 2. Interpretação dos dados sorológicos (detecção de anticorpos)

O maior problema da interpretação dos soros positivos é causado pela existência de reações cruzadas, sobretudo em IH, entre arbovírus do mesmo grupo. Não existe regras absolutas mas apenas "dicas" e alguns critérios, deduzidos da experiência pessoal do pesquisador.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para interpretação de resultados sorológicos com reações cruzadas (resposta secundária):

a) avaliar a possibilidade do paciente ter sido vacinado contra FA e adoecido com outro *Flavivirus*;

b) avaliar a possibilidade do paciente ter contraído uma FA silvestre assintomática e recuperado;

c) avaliar a possibilidade do paciente ter contraído sucessivamente DEN1 e DEN2;

d) avaliar a possibilidade do paciente ter contraído uma infecção por um vírus de tipo ainda desconhecido, cruzando sorologicamente com os conhecidos, etc...

Neste sentido, para resolver essas dúvidas, o melhor é testar o mesmo soro por mais de um método. Por exemplo, a triagem pode ser feita com o teste IH, os duvidosos (positivos com mais

de um vírus com títulos próximos) são, então testados por neutralização.

### 5. 3. 3. Interpretação dos dados clínicos (diagnóstico da doença)

É quase impossível estabelecer um conjunto de sinais e sintomas característicos das afecções por arbovírus. Assim, é **indispensável**, especialmente em casos de doença febril aguda, conservar a - 70°C uma amostra de sangue para tentar o isolamento de vírus e, a - 20° C, ter soro para a realização de testes sorológicos, e se for possível, obter outra amostra de soro 14 - 21 dias após a coleta da 1ª.

O diagnóstico conclusivo para uma doença causada por arbovírus é então confirmado através **isolamento** do vírus ou detecção de uma **conversão sorológica** entre o soro "agudo" e o soro "convalescente", bem como por detecção de antígenos virais específicos em peças (fígado no caso da FA; fígado, baço e pulmões no dengue; cérebro em vírus encefalitogênicos) e, ainda, pela detecção de IgM específica pelo método imunoenzimático (MACELISA).

### 5. 3. 4. Interpretação dos dados entomológicos

Os dados entomológicos sofrem geralmente de escassez em relação a outros tipos de dados. Essa situação é paradoxal quando se sabe que até agora, os únicos meios de combate relativamente eficaz contra a Dengue são dirigidos contra o mosquito!

A necessidade de obter informações entomológicas é, também, justificada pela grande variedade de parâmetros climáticos e biológicos que interferem com a capacidade vetorial do mosquito.

Outro aspecto necessário é o de realizar-se estudos longitudinais, durante períodos longos, a fim de eliminar as variações devidas aos métodos amostrais ou variações sazonais.

## 6. Elaboração de projetos de pesquisa

Devido a complexidade dos problemas, os projetos de pesquisa sobre a transmissão dos arbovírus têm que satisfazer vários critérios.

A elaboração de projetos têm que levar em conta, de uma maneira integrada:

- a) os conhecimentos já acumulados na literatura;
- b) o caráter fundamental ou aplicado da pesquisa projetada;
- c) os recursos humanos e as possibilidades de formação profissional e, criação de vagas para técnicos e pesquisadores;
- d) os recursos financeiros para a renovação e/ou atualização do material disponível;
- e) a necessidade de ampla divulgação dos resultados.

**Agradecimentos.** Os autores agradecem ao Dr. Mario Augusto Pinto Moraes que os esclareceu sobre a técnica de imunohistoquímica, e o Sr. Adlai Raimundo Souza (FNS), pela realização minuciosa das figuras 4 a 9.

## Anexo 1

### Materiais e procedimentos para tentativas de isolamento de arbovírus.

#### 1. Tentativa de isolamento em camundongos recém-nascidos

##### 1. 1. Materiais

- a) Camundongos recém-nascidos (2 - 3 dias)
- b) Especimen (sobrenadante do material suspeito)
- c) Albumina bovina 0,75 % em PBS (solução fosfatada tamponada)

##### 1. 2. Procedimento

- a) Inocular 0.02ml do especimen diluído 1:10 em albumina bovina 0,75 % em PBS por via intracerebral a uma família ou grupo de camundongos (normalmente 6 filhos e 1 mãe)
- b) Examinar os camundongos diariamente (se necessário 2 x) e anotar as observações, usando o seguinte código:

|                  |                 |
|------------------|-----------------|
| ? - desaparecido | M - moribundo   |
| E - estragado    | + - morto       |
| D - doente       | ± - sacrificado |

Obs.: Lembrar que a doença ou morte dos camundongos podem ser devidos, afora a presença de um agente infeccioso, à toxicidade do inóculo, contaminação bacteriana, etc. Assim, se os camundongos morrem no 1º dia após inoculação, diluir mais o inóculo ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) e repetir a inoculação. O uso de filtro também é muito útil nesses casos.

c) Os camundongos que apresentam sinais de doença são sacrificados para novas passagens, identificação, liofilização ou conservação a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 2. Tentativa de isolamento em cultura de células

##### 2. 1. Materiais

##### 2. 1. 1. Reagentes

- A. Meio L15 modificado (Células C6/36)
- B. Solução de albumina bovina a 0,75 % com antibióticos
- C. Meio MEM de Eagle (Células VERO)
  - Tripsina
  - L-Glutamina
  - HEPES solução
  - Soro bovino fetal

##### 2. 1. 2. Equipamentos e utensílios

- A. Cabine de fluxo laminar
- B. Microscópio invertido
- C. Centrífuga
- D. Autoclave
- E. Destilador
- F. Estufa regulada para  $180^{\circ}\text{C}$ .
- G. Bomba de vácuo/pressão
- H. Geladeira
- I. Freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- J. Freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

- K. Balança eletrônica
- L. Lavador de pipetas
- M. Filtro 0.22 nm (Millipore)
- N. Pipetador automático (Pipet-aid)

## 2. 2. Procedimento

### 2. 2. 1. Células de *Aedes albopictus* clone C6/36

#### 2. 2. 1. 1. Preparo de tubos com células

- a) Semear tubos 16 x 125 mm com 2 ml de suspensão de células do clone C6/36 em uma concentração de aproximadamente 300000 células/ml em meio L15 crescimento.
- b) Manter à temperatura ambiente até o monolayer ficar confluento. Normalmente por um período de 3 dias.
- c) Trocar o meio de crescimento por meio de manutenção.

#### 2. 2. 1. 2. Preparo do inoculo

- a) Fazer uma suspensão a 10 % - após maceração em gral e pistilo de porcelana - em solução tamponada de albumina bovina a 0,75 % com antibióticos ou em meio L15 manutenção, se o(s) espécimen(s) suspeito(s) for(em) fragmento(s) de órgão(s). Se for soro ou sangue diluir a 10 %.
- b) Centrifugar a 2100 rpm por 10 min.
- c) Retirar o sobrenadante.
- d) Inocular 0,2 ml em tubos de células contendo 2 ml do meio de manutenção. São inoculados geralmente 2 tubos por material, deixando-se sempre 2 para controles negativos.

#### 2. 2. 1. 3. Leitura e observação

- a) Fazer leitura diariamente em microscópio invertido para observação de efeito citopatogênico (ECP).
- b) Se houver suspeita de ECP, colhe-se para fazer identificação por imunofluorescência.
- c) Se até o 14º dia de leitura não houver detecção de ECP, colher para imunofluorescência.

### 2. 2. 2. Células VERO

#### 2. 2. 2. 1. Preparo de tubos com células

- a) Semear tubos 16 x 125 mm com 1 ml de suspensão de células VERO em uma concentração de aproximadamente 200000 células/ml em meio MEM EAGLE completo (crescimento) em estufa a 35-37°C.
- b) Manter a temperatura do monolayer constante por um período de 3 dias
- c) Trocar o meio de crescimento por meio de manutenção.

#### 2. 2. 2. 2. Preparo do inoculo

- a) Fazer uma suspensão a 10 % - após maceração em gral e pistilo de porcelana - em solução tamponada de albumina bovina a 0,75 % com antibióticos ou em meio MEM EAGLE manutenção se o(s) espécimen(s) suspeito(s) for(em) fragmento(s) de órgão(s). Se for soro ou sangue diluir a 10 %.
- b) Centrifugar a 2100 rpm por 10 min.
- c) Retirar o sobrenadante.
- d) Inocular 0,1 ml em tubos de células contendo 1 ml do meio de manutenção. São inoculados geralmente 2 tubos por material, deixando-se sempre 2 para controles negativos. Coloca-los em estufa a 35 - 37° C.

#### 2. 2. 2. 3. Leitura e observação

- a) Fazer leitura diariamente em microscópio invertido para observação de ECP.
- b) Se houver suspeita de ECP, colhe-se para fazer identificação por neutralização em CT.
- c) Se até o 14º dia de leitura não houver detecção de ECP, considera-se o material negativo.

## Anexo 2

### Materials e procedimentos para realização do teste de fixação do complemento (FC)

#### 1. Materiais

1. 1. Reagentes e soluções
  - A. Antígenos
  - B. Soro imune específico para o vírus (controle positivo)
  - C. Soro heterólogo (controle negativo)
  - D. Complemento
  - E. Hemolisina
  - F. Veronal diluído (5 x)
  - G. Glóbulos de carneiro coletados em alsever
1. 2. Equipamentos e outros utensílios
  - A. Placas para teste
  - B. Centrífuga
  - C. Estufa 37° C
  - D. Banho maria a 60° C e 37° C
  - E. Cabine de fluxo laminar
  - F. Pipeta calibrada unicanal (25 - 200 µl)

#### 1. 3. Vidrarias diversas

#### 2. Procedimentos

##### 2. 1. Primeira etapa

##### 2. 1. 1. Preparação do antígeno

Retira-se o cérebro do camundongo inoculado com material suspeito (vide anexo 1), tomando o cuidado de suspender em veronal diluído (1 ml para cada cérebro). A seguir a suspensão é colocada em tubo 13 x 100 (ou 12 x 75) que devidamente arrolhado é centrifugado por 5 min. a 2500 rpm. Após, faz-se diluições seriadas (1:4, 1:8, 1:16, etc.) do sobrenadante usando sempre o veronal diluído como diluente. Está pronto para uso.

##### 2. 1. 2. Preparação dos soros

Todos os soros a serem usados nos testes são diluídos em série (iniciando 1:8) no veronal diluído. Feitas as diluições os mesmos são inativados a 60° C por 20 min. (ou 56° C / 30 min.). Uma vez inativados, os soros estão prontos para serem usados.

##### 2. 1. 3. Preparação do complemento

O sistema complemento é obtido de cobaias (em torno de 15 animais). Colhe-se o sangue dos mesmos, seguindo-se centrifugação e decantação do sobrenadante. Faz-se um lote dos soros e alíquotam-se em frascos contendo em média 2 ml de complemento que é estocado a - 70° C. O complemento depois de titulado deve ser diluído em veronal imediatamente antes do uso. O complemento diluído que sobrar deve ser desprezado.

A técnica é ilustrada na fig. 5: coloca-se por orifício 1 gota do soro, 2 gotas de complemento diluído e 1 gota do antígeno, observando-se as diluições do soros e antígenos usadas no teste. Tampa-se a(s) placa(s) para evitar evaporação. Deixa-se a(s) placa(s) em repouso "overnight" (em torno de 16 horas).

## 2. 2. Segunda etapa

### 2. 2. 1. Preparação do sistema hemolítico

#### 2. 2. 1. 1. Preparação dos glóbulos

Faz-se sucessivas lavagens (centrifugações) a 2500 rpm por 5 min. dos glóbulos de carneiro. As lavagens (cerca de 3) são feitas usando veronal diluído. Após as lavagens, os glóbulos são diluídos 1:40 (0,1 ml de glóbulos em 3,9 ml de veronal diluído) e estão prontos para serem usados no teste.

#### 2. 2. 1. 2. Preparo da hemolisina

Hemolisina glicerinada pura (comercialmente obtida) conservada em geladeira é diluída 1:100 em veronal diluído. Nesta concentração é estocada a - 20° C. Para uso no teste dilue-se de acordo com o título previamente determinado.

### 2. 3. Descrição da técnica

Partes iguais (v / v) de glóbulos de carneiro (1:40) e hemolisina (1:800) são misturadas em um frasco. Após, coloca-se a mistura (sistema hemolítico) para sensibilizar (sistema antígeno-anticorpo) em banho maria a 37° C por 15 min. Simultaneamente retira-se a(s) placa(s) da geladeira e coloca-se na estufa a 37° C, por igual período. A seguir, coloca-se 2 gotas do sistema hemolítico em cada orifício usado. Agita-se a(s) placa(s). Incuba-se (estufa 37° C) por 30 minutos, agitando-se a(s) mesma(s) cada 10 min. Finalmente, após os 30 min. deixa-se a(s) placa(s) em repouso na geladeira. Faz-se a leitura cerca de 3 hs.

### 2. 4. Leitura

Depende do grau de hemólise. Atribui-se valores de 0 a 4 de acordo com os percentuais de hemólise observada visualmente:

- 0 % de hemólise (reação positiva): valor 4
- 25 % de hemólise (reação positiva): valor 3
- 50 % de hemólise (reação negativa): valor 2
- 75 % de hemólise (reação negativa): valor 1
- 100 % de hemólise (reação negativa): valor 0

## Anexo 3

### Materiais e procedimentos para realização do teste de imunofluorescência (IF)

#### 1. Materiais

##### 1. 1. Reagentes

- A. Anticorpos monoclonais ou fluidos ascíticos hiper-ímmunes dos vírus em questão.
- B. Conjugado anticamundongo (anti-espécie do anticorpo usado)
- C. Conjugado específico para o vírus a pesquisar
- D. PBS pH 7,5
- E. Glicerol tamponado
- F. Acetona P.A.

##### 1. 2. Equipamentos

- A. Criostato
- B. Cabine de fluxo laminar
- C. Microscópio de imunofluorescência
- D. Estufa a 37° C.
- E. Freezer a - 20° C

F. Geladeira

1. 3. Vidrarias diversas

**2. Procedimentos**

2. 1. Preparo de lâmina para imunofluorescência

2. 1. 1. A partir de tecidos

- a) Fazer cortes de 2 - 3  $\mu\text{m}$  de espessura, em criostato, de fragmentos de tecido;
- b) Fixar os cortes nas lâminas previamente desengorduradas. A fixação é feita por imersão em acetona gelada por 10 min.;
- c) Secar a temperatura ambiente;
- d) Estocar a - 70° C se não for executar o teste em seguida ou continuar com o teste;

Obs.: Realizar o mesmo procedimento para as amostras controles positivo e negativo;

2. 1. 1. A partir de cultivos celulares

- a) Misturar vigorosamente os tubos com células ou raspar as células da parede do tubo, caso seja necessário.
- b) Deixar em repouso por 10 min.
- c) Retirar metade do fluido da cultura.
- d) Homogeneizar a suspensão das células.
- e) Preparar as lâminas colocando cerca de 20  $\mu\text{l}$  em cada círculo.
- f) Deixar secar a temperatura ambiente.
- g) Fixar em acetona gelada em copos de Koplin por 10 min.
- h) Secar a temperatura ambiente.
- i) Colocar a - 70° C ou seguir com o procedimento.

Obs.: Realizar o mesmo procedimento para o controle positivo e negativo.

**3. Técnica de imunofluorescência direta**

- a) Retirar as lâminas da acetona ou do - 70° C e deixar secar à temperatura ambiente.
- b) Colocar 10  $\mu\text{l}$  do conjugado específico para o vírus a pesquisar, diluído em PBS pH 7,5 (diluição ótima pré-estabelecida).
- c) Levar à estufa a 37° C, em câmara úmida durante 30 min.
- d) Lavar 2 vezes em PBS pH 7,5; uma rinsagem rápida e outra de 10 min.
- e) Rinsar rapidamente em água destilada.
- f) Secar a temperatura ambiente.
- g) Montar lamínula em glicerol tamponado.
- h) Fazer leitura em microscópio de imunofluorescência. Iniciar o exame pelos controles positivo e negativo, estando os mesmos com leitura satisfatória, examinar as lâminas testes.

**4. Técnica de imunofluorescência indireta**

- a) Como no a) da IF direta.
- b) Colocar 10  $\mu\text{l}$  dos anticorpos monoclonais ou policlonais diluídos em PBS pH 7,5 (diluição ótima pré-estabelecida) usando-se sempre em duplicata. Incluir um anticorpo monoclonal ou policlonal controle negativo.
- c) Seguir os itens c) a f) da IF direta.
- d) Colocar 10  $\mu\text{l}$  de conjugado anti-camundongo diluído em PBS pH 7,5 (diluição ótima pré-estabelecida).
- e) repetir os itens c) a f) da IF direta.
- f) Como no g) da IF direta.
- g) Como no h) da IF direta.

## Anexo 4

### Materiais e procedimentos para realização do teste de inibição da hemaglutinação (IH)

Antes do teste de IH ser processado para detecção de anticorpos, o soro a ser testado deve ser tratado para remover inibidores não específicos que podem impedir a hemaglutinação, causando assim, resultados falsos-positivo.

O kaulim (lavado por ácido) e acetona (quimicamente pura), são materiais comumente usados para remover inibidores não específicos em soros a serem testados contra arbovírus.

Após o soro ser tratado, para remoção de inibidores não específicos, deve ser adsorvido com os mesmos glóbulos usados no teste de IH (no caso específico dos arbovírus, utiliza-se glóbulos de ganso), com o objetivo de remover aglutininas naturais que podem causar resultados falsos-negativo.

#### 1. Materiais

##### 1. 1. Reagentes

- A. ACD (Acido - Citrato - Dextrose)
- B. DGV (Dextrose - Gelatina - Veronal)
- C. Hemácias de ganso
- D. Soluções-estoque A, B, C, D, E
- E. Borato salina pH 9,0
- F. Albumina bovina 4 % em solução borato-salina pH 9,0
- G. Albumina bovina 0,4 % em solução borato-salina pH 9,0
- H. Soluções para pH's 6,0 e 7,0
- I. Antígenos (Sucrose-acetona (SA) / beta propiolactona (BPL) inativado)
- J. Soros controles (soro homólogo e soro conhecido negativo)

##### 1. 2. Equipamentos e outros utensílios

- A. Cabine de fluxo laminar
- B. Espectrofotômetro
- C. Centrífuga refrigerada
- D. Utensílios para microtécnica:
  - placas em U
  - pipetas contagotas
  - microdiluidores
- E. Seringas, agulhas

##### 1. 3. Vidrarias diversas

#### 2. Preparação de hemácias de ganso

O ganso doméstico (*Anser cinereus*) adulto, preferentemente branco e macho é o animal de escolha. Obtém-se assepticamente da veia jugular ou da asa do animal, a quantidade de sangue necessária para prover glóbulos para 1 - 2 semanas. Usar agulha nº 20 acoplada a uma seringa, contendo 1,5 ml de ACD para cada 8,5 ml de sangue a ser coletado. A seguir, o sangue coletado é centrifugado (15 minutos a 2000 rpm). Despreza-se o sobrenadante e os glóbulos são lavados a seguir, quatro vezes em DGV (um volume de glóbulos e três volumes de DGV).

No final, após as lavagens, as hemácias devem ser suspensas 1:5 em DGV.

Para uso na adsorção de aglutininas os glóbulos devem ser lavados três vezes em albumina bovina 0,4 % em pH 9,0 e, suspensos 1:6, nessa solução.

### **3. Tratamento do soro**

Os soros são tratados para remover inibidores naturais não específicos e adsorvidos com glóbulos vermelhos para remover aglutininas não específicas. O tratamento, pode ser por adsorção pelo kaulim (tem o inconveniente de remover anticorpos IgM) ou por extração por acetona (que não afeta esta classe de anticorpos). Assim, a extração por acetona, deve ser preferida para tratamento de soros em fase aguda ou convalescente-recente. Ambos os tratamentos, contudo, não afetam anticorpos IgG.

#### **3. 1. Adsorção pelo kaulim**

##### **3. 1. 1. Reagentes**

- A. Soro-teste
- B. Controles positivo e negativo
- C. Borato salina pH 9,0
- D. Kaulim a 25 %

##### **3. 1. 2. Procedimento**

- a) Usar tubos (13 x 100 mm) rotulados e ajuntar:
  - Soro (1 volume): 0,1 ml
  - Borato salina pH 9,0 (4 volumes): 0,4 ml
  - Suspensão de kaulim a 25 % (5 volumes): 0,5 ml
- b) Agitar a mistura vigorosamente.
- c) Deixar à temperatura ambiente (22° a 27° C) por 20 - 30 minutos, agitando em intervalos de 5 a 10 minutos.
- d) Centrifugar a 2500 rpm por 30 minutos.
- e) Decantar o sobrenadante para tubos limpos e transferir o rótulo.
- f) Este sobrenadante corresponde à diluição 1:10 do soro original.

#### **3. 2. Extração por acetona**

##### **3. 2. 1. Reagentes**

- A. Soro-teste.
- B. Controle positivo e controle negativo.
- C. Acetona fria a 4° C.
- D. Borato salina, pH 9,0.
- E. NaCl a 0,85 % em água desmineralizada.

##### **3. 2. 2. Procedimento**

- a) Rotular tubos 13 x 100 mm com adesivos que identifiquem cada soro a ser tratado.
- b) Colocar 2 gotas (0,05 ml) do soro.
- c) Misturar com 9 volumes de NaCl, 0,85 % (0,45ml), para se obter uma diluição 1:10 do soro.
- d) Ajuntar 12 volumes (6 ml) de acetona fria.
- e) Misturar o soro e a acetona delicadamente, deixar 5 min em banho de gelo e centrifugar a 2000 rpm por 1 min. Desprezar o sobrenadante.
- f) Ajuntar a mesma quantidade de acetona fria usada acima ao precipitado e misturar vigorosamente. Deixar 1 hora em banho de gelo ou 4° C.
- g) Centrifugar a mistura soro-acetona a 2000 rpm por 5 min. Desprezar o sobrenadante.
- h) Secar o precipitado a vácuo, por 1 hora.
- i) Dissolver o pó em um volume de borato salina, pH 9,0, igual a 10 vezes o volume inicial do soro. Exemplo: se o volume inicial do soro foi 0,05ml, o volume de borato salina para resuspensão do precipitado será de 0,5 ml (0,05 ml x 10 = 0,5 ml).
- j) Deixar o precipitado em solução "overnight" no refrigerador ou por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação ocasional.

### **4. Adsorção de aglutininas**

- a) Colocar a estante com os soros tratados por acetona em um banho de gelo.
- b) Ajuntar 0,6 ml da suspensão 1:6 de glóbulos de ganso e agitar.

- c) Deixar a mistura soro-glóbulos em banho de gelo, por 20 minutos, agitando ocasionalmente.
- d) Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, de preferência, em centrífuga refrigerada.

Obs.: é importante manter a mistura soro-glóbulos fria, para evitar hemólise dos glóbulos.

- e) Transferir o sobrenadante para tubos limpos 12 x 75 mm, bem como o rótulo.

O sobrenadante é o soro diluído 1:20 e está pronto para ser testado. Pode ser guardado a - 20° C por várias semanas, sem perda apreciável em títulos.

### 5. Teste de hemaglutinação (Fig. 3 A)

A demonstração de atividade hemaglutinante, HA por arbovírus é pH dependente e diferentes arbovírus variam na faixa de pH de atividade ótima e o título produzido. Assim, é necessário, titular o mesmo antígeno na presença de diferentes soluções de pH para determinar o título ótimo HA.

#### 5. 1. Materiais

##### 5. 1. 1. Reagentes

- A. Hemácias de ganso
- B. Diluentes ajustados: pH 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8 e 7,0.
- C. Antígenos.
- D. Albumina bovina a 0,4 % em borato salina pH 9,0.

##### 5. 1. 2. Equipamentos e outros utensílios

- A. Placas em U
- B. Pipetas contagotas
- C. Microdiluidores
- D. Agitador de placas

#### 5. 2. Procedimento

- a) Escrever a microplaca como indicado na placa padrão (vide anexo).
- b) Ajustar 0,05 ml de albumina bovina 0,4 % em pH 9,0 à cada orifício, omitindo o primeiro de cada fila.
- c) Preparar uma diluição 1:10 do antígeno viral e ajustar 0,1 ml ao primeiro orifício de cada fila.
- d) Preparar diluições seriadas (2 x) do antígeno em volumes de 0,05 ml com "loops" de 0,05 ml.
- e) Após completar as diluições, enxugar os "loops" e flambar.
- f) Adicionar 0,05 ml da suspensão de hemácias nos pH's selecionados em cada orifício e agitar (agitador mecânico).
- g) Cobrir a placa e incubar por 30 - 60 minutos a 37° C ou temperatura ambiente.
- h) Examinar e escrever o padrão hemaglutinante observado, como segue:
  - + : hemaglutinação completa - delgada película de glóbulos, uniformemente ajustada a curvatura do orifício.
  - + : tênue anel de células não aglutinadas.
  - + : traços de células aglutinadas em torno de um botão de glóbulos sedimentados.
  - O : não hemaglutinação - formação de botão sem associação com hemácias aglutinadas.
- i) Desses resultados, determinar o título hemaglutinante e o pH ótimo para cada antígeno. O título HA (uma unidade) é a mais alta diluição na qual completa HA ocorre. O pH ótimo é aquele pH no qual o antígeno apresenta maior título. No teste de IH, 4 - 8 unidades / 0,025 ml de antígeno no pH ótimo é requerido. Para determinar a diluição contendo 4 unidades / 0,025 ml, começar pelo título HA no pH ótimo e contar 4 diluições em vez de 3, a partir do "endpoint".

Se o título do antígeno é 1:2560, por exemplo, então,

- 1:2560 = 1 u / 0,05 ml
- 1:1280 = 2 u / 0,05 ml
- 1:640 = 4 u / 0,05 ml
- 1:320 = 8 u / 0,05 ml, 4 u / 0,025 ml
- 1:160 = 16 u / 0,05 ml, 8 u / 0,025 ml

Assim, a diluição 1:10 do antígeno, deve ser diluída 1 parte + 31 partes para dar uma diluição que contenha 4 u / 0,025 ml., ou, 1 parte + 15 partes para dar uma diluição que contenha 8 u / 0,025 ml.

Obs. O mesmo antígeno extraído do cérebro de camundongos pode ser usado para os testes de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e ELISA, nas diluições apropriadas para cada técnica.

## **6. Inibição da hemaglutinação (Fig. 3 B)**

### 6. 1. Materiais

#### 6. 1. 1. Reagentes

- A. Antígenos
- B. Soros tratados
- C. Controles positivo e negativo
- D. Albumina bovina 0,4 % em pH 9,0
- E. Suspensão de glóbulos de ganso
- F. Diluentes ajustados no pH selecionado

#### 6. 1. 2. Equipamentos e outros utensílios

- A. Placas em U
- B. Pipetas contagotas
- C. Microdiluidores
- D. Agitador de placas

#### 6. 1. 3. Procedimento

a) Diluir os antígenos em albumina bovina 0,4 % em pH 9,0, ajustados para 4 ou 8 unidades por 0,025 ml.

b) O ideal, é usar uma placa por antígeno. Assim, se 8 soros são testados contra 4 antígenos, serão necessárias, 4 placas.

c) Os soros (tratados e adsorvidos) são testados usando 4, 8 ou 12 diluições para cada antígeno, dependendo do objetivo proposto. Cada teste deve incluir: controle positivo (soro homólogo), assim como, controle negativo.

d) Um procedimento alternativo, consiste em fazer uma triagem com soros diluídos 1:20, contra 1 ou mais antígenos e, somente fazer a titulação, daqueles positivos nesta diluição.

e) Distribuir 0,025 ml do soro-teste e ajuntar 0,025 ml do antígeno (4 - 8 unidades).

f) Cobrir as placas para evitar evaporação.

g) Incubar a 4° C, "overnight" (18 horas).

h) Na manhã seguinte, ajuntar 0,05ml de glóbulos de ganso, diluído no pH apropriado. Agitar a placa.

i) O teste é incubado por 30 - 60 minutos à temperatura ambiente ou a 37° C (de acordo com o tipo do vírus). Observar a formação do botão.

j) A inibição da hemaglutinação é indicada por uma reação negativa (formação do botão) e é interpretada como positiva (Fig. 4). O título IH<sub>1</sub> é tido como a mais alta diluição do soro, que causa completa ou quase completa, inibição da hemaglutinação.

## **Anexo 5**

# **Materiais e procedimentos para realização do MAC-ELISA**

## **1. Materiais**

### 1. 1. Reagentes e soluções

- A. PBS pH 7,4
- B. Albumina bovina a 4 % emPBS pH 7,4
- C. Soro humano normal (sem anticorpos para arbovírus) tratado por acetona (SHN).

- D. SHN (tratado por acetona) a 20 % em PBS pH 7,4
- E. Tampão carbonato pH 9,6
- F. Imunoglobulina de cabras anti-IgM humana: TAGO ou Kirkegaard and Perry Laboratories
- G. Antígenos virais com 16 unidades hemaglutinantes / 0,05 ml.
- H. Fluido ascítico hiperimune (FAI) ou soro imune.
- I. Conjugado "Peroxydase-labeled affinity purified antibody to mouse IgG" ou "6B6C1 monoclonal conjugated" by Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
- J. Substrato ABTS: Kirkegaard and Perry Laboratories

### 1. 2. Equipamentos e utensílios

- A. Placas de polyvinyl fundo em U: Dynatech Laboratories, Inc.
- B. Lavador de placas: "Nunc Immuno wash".
- C. Bomba de vácuo.
- D. Pipetas automáticas mono e multicanal.
- E. Cubetas.
- F. Estufa.
- G. Freezer a - 60° C.
- H. Freezer a - 20° C.
- I. Geladeira.
- J. Ponteiras para pipetas automáticas.
- K. Espectrofotometro (Multiskan) com filtro 405 nm.

### 1. 3. Vidrarias diversas

## 2. Procedimentos

### 2. 1. Diagnóstico de Dengue, Febre amarela e Rocio.

- a) Preparação da placa: lavar a placa 5 vezes com PBS pH 7,4 e batê-la suavemente até que seque.
- b) Sensibilização:
  - cobrir cada orifício com 100  $\mu$ l de anti IgM humana\* diluída em tampão de carbonato pH 9,6.
  - incubar "overnight" a 4° C.
  - lavar a placa 5 vezes; secar.
- c) Bloqueio:
  - encher os orifícios com albumina bovina a 4 % em PBS pH 7,4.
  - incubar 30 min. em temperatura ambiente.
  - lavar a placa 5 vezes; secar.
- d) Soros e controles (testados em duplicata)\*\*
  - colocar 50  $\mu$ l dos soros a testar e controles diluídos 1:40 em SHN a 20 % em PBS pH 7,4.
  - incubar 2 horas em temperatura ambiente.
  - lavar a placa 5 vezes; secar.
- e) Antígeno\*:
  - colocar 50  $\mu$ l do antígeno diluído em SHN a 20 % em PBS pH 7,4.
  - incubar "overnight" a 4° C.
  - lavar a placa 5 vezes; secar.
- f) Conjugado:
  - colocar 25  $\mu$ l de "HRP conjugated 6B6C-1 monoclonal antibody / Jackson immuno research" diluído em SHN a 20 % em PBS pH 7,4.
  - incubar 1 hora a 37° C.
  - lavar a placa 7 vezes; secar.
- g) Substrato:
  - colocar 100  $\mu$ l de substrato ABTS, solução A + solução B a 50 %.
  - incubar 30 min. a 37° C.
  - deixar 2 horas em temperatura ambiente.
- h) Leitura: fazer a leitura em espectrofotometro (Multiskan) com filtro 405 nm .

2. 2. Diagnóstico de Mayaro, Oropouche e VEE.

Efetuar o procedimento anterior de a) a e);

Colocar 50 µl de FAI\* na concentração ótima, diluído em SHN a 20 % em PBS pH 7,4; incubar 2 horas em temperatura ambiente e lavar a placa 7 vezes; secar.

Seguir os procedimentos acima de f) a h), utilizando-se o "Peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgG" no lugar do "HRP conjugated 6B6C-1 monoclonal antibody / Jackson immuno research".

\*A anti-IgM humana, o antígeno, o conjugado e o FAI são previamente titulados para se determinar a diluição ótima a ser utilizada no teste.

\*\*Utiliza-se seis soros conhecidos como controle do teste: quatro negativos e dois positivos, sendo um fracamente e outro fortemente positivo.

3. Cálculo e interpretação dos resultados

A leitura obtida no Multiskan é submetida à fórmula abaixo, e são considerados positivos os soros que apresentarem resultado maior que dois. Não será necessário submeter ao cálculo aqueles soros que possuírem absorvância média menor que 0,2, por já serem considerados negativos. Vale frisar que a absorvância média dos controles negativos deve ser inferior a 0,1, para que se possa considerar bom o teste.

$$\frac{\text{Absorvância média do soro-teste}}{\text{Absorvância média dos controles negativos}}$$

## Anexo 6

Materiais e procedimentos para realização do teste de neutralização (TN, N ou SN) em camundongos recém-nascidos (Diluição constante do soro e concentrações variadas do vírus).

1. Reagentes e soluções

- A. Vírus, suspensão 1:5
- B. Soro homólogo (controle positivo)
- C. Soro normal (controle negativo)
- D. Albumina bovina 0,75 % em PBS (diluyente)
- E. Soro teste

2. Procedimentos

2. 1. Preparação das diluições do virus

Preparar a diluição 1:5 do vírus. Preparar diluições seriadas (10 x) em PBS contendo 0,75 % de albumina bovina. Usar diferentes pipetas para cada diluição.

2. 2. Preparação das suspensões a ser inoculadas

- a) juntar 1 gota do soro teste, 1 gota do soro homólogo e 1 gota do soro normal.
- b) acrescentar a todos, 3 gotas do diluyente.
- c) juntar 0,1 ml das diluições ótimas do vírus.
- d) proceder uma ou duas (se necessário) titulações do vírus, mediante o uso de 0,1 ml das diferentes diluições e 0,1ml do diluyente.
- e) Agitar a mistura soro-vírus e incubar a 37° C, por 1 hora.

f) Remover a mistura soro-vírus do banho Maria e colocar em banho de gelo.

### 2. 3. Inoculação dos camundongos determinação do título

a) Inocular cada dos 6 camundongos ic com 0,02 ml da mistura.

b) Observar os camundongos diariamente para sinais de doença. Usualmente, os camundongos são observados diariamente por 15 - 21 dias antes do teste ser encerrado.

c) Fazer o resumo do teste.

O logIN (logaritmo do Índice de Neutralização) de cada soro é obtido pela subtração de seu LD<sub>50</sub>, daquele obtido na titulação. Assim, se a diluição LD<sub>50</sub> computada no controle é 10<sup>-7,8</sup> (LD<sub>50</sub> é 7,8) e o do soro desconhecido é 10<sup>-4,9</sup> (LD<sub>50</sub> é 4,9), sua diferença (logIN) é 2,9, ou antilog (IN numérico) = 800.

### Cálculo do título LD<sub>50</sub> pelo método de Reed & Muench (*Am. J. Hyg*, 1938, 27: 493-497).

| Diluição do vírus | Mortos | Sobreviventes | Mortalidade | Valores acumulados |               |         |               |
|-------------------|--------|---------------|-------------|--------------------|---------------|---------|---------------|
|                   |        |               |             | Mortos             | Sobreviventes | Taxa    | Mortalidade % |
| A                 | B      | C             | D           | E                  | F             | G       | H             |
| 10 <sup>-1</sup>  | 6      | 0             | 6 / 6       | 17                 | 0             | 17 / 17 | 100           |
| 10 <sup>-2</sup>  | 6      | 0             | 6 / 6       | 11                 | 0             | 11 / 11 | 100           |
| 10 <sup>-3</sup>  | 4      | 2             | 4 / 6       | 5                  | 2             | 5 / 7   | 71            |
| 10 <sup>-4</sup>  | 1      | 5             | 1 / 6       | 1                  | 7             | 1 / 8   | 13            |
| 10 <sup>-5</sup>  | 0      | 6             | 0 / 6       | 0                  | 13            | 0 / 13  | 0             |

A tabela acima dá um exemplo dos dados obtidos da observação de animais inoculados e ilustra o procedimento de acumulação.

Os valores acumulados para o total de animais que morreram ou sobreviveram são obtidos pela soma nas direções indicadas pelas setas. A taxa de mortalidade acumulada (coluna G) representa o número acumulado de animais mortos (coluna E) sobre o total acumulado de animais inoculados (colunas E + F); por exemplo, na diluição 10<sup>-3</sup> houve 5 mortos de um total de 7 inoculados.

Neste exemplo, a mortalidade na diluição 10<sup>-3</sup> é superior a 50 %, enquanto na 10<sup>-4</sup> é inferior a 50 %. A distância proporcional do "end point" da mortalidade 50 % que liga estas duas diluições, é obtida pela fórmula:

$$\% \text{ mortalidade acima de } 50 \% - 50 \%$$

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

ou:

$$\frac{71 - 50}{71 - 13} = \frac{21}{58} = 0,36 \text{ (ou } 0,4)$$

Desde que, logaritmicamente a distância entre duas diluições é função do fator usado para preparar as séries, por exemplo, 2 x, 4 x, 5 x, 10 x, etc., é necessário corrigir (multiplicar) a distância proporcional pelo logaritmo negativo do fator da diluição usada. No caso das diluições seriadas 10 x, o fator é 1 (log10 = 1), nas diluições seriadas 2 x, o fator é 0,3 (log2,0), nas diluições seriadas 5 x, o fator é 0,7 (log5), e assim por diante.

No procedimento em pauta:

a) Multiplicar o valor interpolativo (distância proporcional) encontrado, pelo log negativo do fator da diluição 10 x usado para obter-se o valor interpolativo corrigido.

log negativo do fator de diluição usado (10 x) = - 1

Valor interpolativo = x 0,4

Valor interpolativo corrigido = - 0,4

b) A diluição associada com 50 % de mortalidade é localizada entre as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ .

c) O log<sub>10</sub> da diluição 50 % é estimado pela soma do valor interpolativo corrigido ao log da diluição acima de 50 %.

$- 3 + (- 0,4) = - 3,4$

d) A diluição 50 % é então estimada como  $10^{-3,4}$

e) O título é estimado como  $LD_{50} = - 3,4$  ou  $\log LD_{50} = 10^{-3,4}$

## Anexo 7

### Materiais e procedimentos para preparação de insumos básicos, reativos e soluções.

#### 1. Antígenos HA

Inúmeras técnicas têm sido descritas para preparo de antígenos HA para arbovírus. A técnica de sucrose-acetona tem se mostrado satisfatória, dando um antígeno estável com títulos elevados. Outras técnicas descritas, como a do soro-vírus, extraído por acetona, também têm produzido antígenos satisfatórios para determinados arbovírus.

A obtenção destes antígenos, apresenta risco em potencial e, é importante que cuidados sejam tomados, na manipulação do vírus, no uso da acetona (inflamável) e do BPL (betapropiolactona) por ser substância cancerígena. Devem ser preparados em cabine de fluxo laminar sob pressão negativa.

1. 1. Extração por sucrose acetona (antígeno de cérebro de camundongo)

1. 1. 1. Materiais requeridos

1. 1. 1. 1. Reagentes

A. Sucrose.

B. Acetona.

C. Borato salina pH 9,0.

D. Betapropiolactona (BPL).

1. 1. 1. 2. Equipamentos

A. Cabine de fluxo laminar.

B. Centrífuga refrigerada.

1. 1. 2. Obtenção de cérebros de camundongos infectados

a) Camundongos recém-nascidos (1 - 2 dias de idade) são inoculados intra-cerebralmente com 0,02 ml de uma suspensão de cérebro de camundongo infectado. Isto é usualmente obtido, a partir de uma diluição 1 / 10 preparada em solução tamponada de albumina bovina 0,75 % (ver fórmula no anexo 7).

b) Os camundongos inoculados são examinados duas vezes ao dia, para observar sinais de doença. Quando a maioria dos camundongos apresentar tais sinais, sacrificá-los.

c) Os cérebros são removidos assepticamente e colocados em uma placa de petri e guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o preparo do antígeno. O camundongo inteiro também pode ser guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  e o cérebro removido no dia do preparo do antígeno.

### 1. 1. 3. Extração do antígeno

- a) O recipiente contendo os cérebros é pesado, e o peso anotado.
- b) Transferir o tecido para o recipiente onde irá ser homogeneizado.
- c) O recipiente é pesado novamente e o peso dos cérebros coletados é determinado pela diferença.
- d) Quatro volumes de solução aquosa de sucrose a 8,5 % é acrescentado e os cérebros são homogeneizados (ex.: 2 g de cérebros + 8 ml de sucrose 8,5 %).
- e) Ajuntar lentamente o homogeneizado a 20 volumes de acetona fria, (ex.: 10ml do homogeneizado 200 ml de acetona) com o uso de seringa e agulha nº 18.
- f) Deixar cinco minutos no frio (banho de gelo ou refrigerador).
- g) Decantar o sobrenadante e ajuntar o mesmo volume de acetona.
- h) Agitar vigorosamente e deixar 1 hora a frio.
- i) Decantar o sobrenadante.
- j) Secar por 1 hora à temperatura ambiente em uma bomba de vácuo.
- k) Hidratar com NaCl a 0,85 % (com um volume igual a duas vezes o peso em gramas do cérebro. Por exemplo: 4 gramas de cérebro, 8 ml de NaCl a 0,85 %).

l) O sedimento deve dissolver em 1 - 2 horas, mas, é preferível deixar "overnight" a  $4^{\circ}\text{C}$ , para completa hidratação.

m) A solução é então centrifugada a frio (10000 rpm / 60 min) e o sobrenadante é o antígeno que deve ser testado para reatividade HA. Este é um antígeno infeccioso e deve ser manuseado como tal. Se o ensaio é satisfatório, o antígeno é inativado.

n) Preparar 1 % de betapropiolactona (BPL) em água gelada. Ajuntar ao antígeno para dar uma concentração final de 0,3 %. Misturar bem, e deixar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 18 h. Remover uma quantidade para teste e o restante guardar em alíquotas de 1,0 ml a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou liofilizar e guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

o) Teste para infectividade por inoculação intra-cerebral de camundongos de 2 - 3 dias, deve incluir antígeno não diluído e diluições seriadas (10 vezes). O antígeno deve ser não infeccioso após tratamento por BPL.

### 1. 2. Extração por acetona (antígeno de soro-vírus)

Os antígenos HA de soro-vírus, superiores em sensibilidade, estabilidade e segurança àqueles obtidos do cérebro, são produzidos a partir da coleta de soros de camundongos ou hamsters infectados pelo vírus.

a) Camundongos de 1 - 2 dias nascidos ou hamsters de 23 - 25 dias são inoculados ic e sangrados em intervalos de 24, 36, 48 e 72 horas, após inoculação. O tempo ótimo para sangria varia com o vírus.

b) O soro obtido, é diluído 1:4 em salina fisiológica e adicionado com agulha nº 26, em 20 volumes de acetona fria.

c) A mistura é deixada a frio por 5 minutos e a seguir centrifugada por 1 minuto a 2000 rpm.

d) O sobrenadante é decantado e o sedimento suspenso em igual volume de acetona (20 volumes) e agitado vigorosamente.

e) A mistura é deixada a frio por 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ .

f) A seguir a mistura é centrifugada por 5 - 10 minutos a 2000 rpm. A acetona é decantada, e o sedimento seco por 1 hora, em bomba de vácuo.

g) O sobrenadante é hidratado a 1:10 do volume original do soro em borato-salina pH 9.0.

h) É guardado congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou liofilizado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Obs.: O antígeno obtido do soro deve ser preferencialmente usado por ser mais sensível.

## 2. Soros imunes ou fluido ascítico

Antisoros a maioria dos arbovírus podem ser produzidos em uma série de animais de grande porte tais como cavalos, gado bovino, bodes, ou de pequeno porte, especialmente roedores como coelhos, cobaias, hamster, ratos albinos e camundongos. Face a facilidade no manejo, ocupação de pequeno espaço no laboratório, e por constituir-se no animal de escolha para isolamento de arbovírus e oferecer

uma ótima resposta imune, os camundongos albinos "Swiss" são preferencialmente utilizados para a obtenção de antisoros específicos. Recentemente, com o advento dos anticorpos monoclonais, os camundongos "Balb C" tem sido utilizados para a obtenção desses anticorpos. No entanto, os anticorpos monoclonais apesar de serem ideais para uso em laboratório são muito caros e, requerem o uso de substâncias e materiais que não se encontram disponíveis na maioria dos laboratórios. Desse modo, abordaremos somente o método de obtenção de anticorpos usando os camundongos albinos "Swiss".

## 2. 1. Materiais

- A. Camundongos "swiss" jovens em grupos de 6 por caixa.
- B. Virus estoque.
- C. Solução de cloreto de sódio 0.85 % estéril.
- D. Seringa tipo tuberculina de 1 ml (graduações de 0,2 ml).
- E. Agulhas descartáveis tamanho 25 x 7.
- F. Gral e pistilo de porcelana.
- G. Luvas
- H. Cabine de fluxo laminar
- I. Centrífuga
- J. Pipetas Pasteur
- K. Bulbo de borracha
- L. Tubos de ensaio 13x100
- M. Éter sulfúrico
- N. Grampos de alumínio
- O. Suporte de madeira

## 2. 2. Preparação do imunógeno

Retira-se o cérebro (cerca de 0,2 g) de um camundongo infectado estocado em frigorífico a - 70° C. A seguir, macera-se o material em gral de porcelana com pistilo. Acrescenta-se ao macerado 1,8 ml de solução de NaCl 0,85 % fria estéril (0,2 + 1,8 ml fica 1:10). Mistura-se com o pistilo para formar uma suspensão que é colocada a seguir em frasco adequado está pronta para ser aplicada nos animais.

Obs.: Esse procedimento deve ser executado em cabines de fluxo laminar com fluxo vertical. O operador deve calçar luvas e, todo o cuidado deve ser tomado para evitar a formação de aerossóis. Após o uso, a cabine deve ser limpa com solução de hipoclorito de sódio a 1 %, preparada recentemente e esterilizada com radiação ultravioleta, por pelo menos 15 min. Somente após esses procedimentos é que o fluxo deverá ser desligado e / ou alternativamente, a cabine, ser usada para outros fins.

## 2. 3. Imunização dos grupos

Cada frasco com suspensão deve estar devidamente rotulado contendo informações sobre a amostra usada (números de série (grupos de origem), número da passagem e data do preparo). Com a seringa de 1 ml e agulha, retira-se 1 ml da suspensão (previamente homogeneizada por discreta agitação do frasco) e inocula-se 0,2 ml da mesma por via intraperitoneal (ip) em cada camundongo jovem selecionado.

Faz-se em média 4 imunizações semanais. Ao final de 7 dias da 4a. imunização, colhe-se o sangue dos animais por via intracardíaca usando seringa de 1 ml e agulha 25 x 7.

## 2. 4. Coleta do soro imune

Em um recipiente de vidro contendo éter sulfúrico coloca-se o camundongo imunizado. Após alguns segundos o animal fica anestesiado. Assim, é imobilizado com grampos de alumínio em um suporte de madeira e colhe-se imediatamente o sangue. Repete-se a operação para os outros animais. Posteriormente, centrifuga-se os tubos com o sangue por 10 minutos a 3000 rpm. Decanta-se o sobrenadante ou usando-se pipeta Pasteur acoplada a uma pera de borracha, aspira-se o soro obtido, que deverá ser guardado em frascos ou tubos devidamente rotulados e tampados, e estocado em freezer a - 20° C.

Em geral os soros imunes obtidos após 4 imunizações contém elevados títulos de anticorpos. Entretanto, em alguns casos em que não se obtenha bons títulos pode-se fazer uso de adjuvantes (o mais

usado é o incompleto de Freund) para melhorar a resposta imune. Aplica-se, por via ip partes iguais v / v de suspensão e adjuvante.

Quando se deseja obter grande quantidade de fluido imune, 3 dias após a 4a. imunização aplica-se 0,2 ml por camundongo via IP de suspensão 1:5 de Sarcoma 180 / TG (TG = Thioguanidine resistant) obtido por passagens sucessivas de células cancerosas tipo sarcoma, que produzem ascite em camundongos. Quatro dias após a aplicação do sarcoma (portanto 7 dias após a 4a. vacina), aplica-se uma 5a. vacina (dose de reforço). O fluido ascítico é recolhido por punção com agulha N° 18 em uma seringa de 10 ml, quando os animais apresentam o abdome volumoso por ascite. Este fluido é rico em anticorpos específicos para o vírus que serviu de imunizante. Vale ressaltar que enquanto um camundongo fornece cerca de 1 ml de sangue, a extração do líquido ascítico fornece cerca de 10 ml. Após a coleta, centrifuga-se o fluido obtido e decanta-se o sobrenadante, que é armazenado a - 20° C.

### 3. Reativos e soluções

#### 3. 1. Soluções utilizadas no test de inibição da hemaglutinação

##### 3. 1. 1. Albumina bovina a 0,75 % em PBS

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 13,6 g ou Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O: 25,7 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,0 g

Preparo: dissolvê-los separadamente em 100 ml de água desmineralizada. 10 ml de cada uma dessas soluções são adicionados a 980 ml de água desmineralizada, contendo 7,0 g de NaCl. A seguir, dissolve-se 7,5 g de albumina de plasma bovino cristalizado (fração V) nessa solução tamponada. A solução de albumina é então filtrada.

##### 3. 1. 2. Acido - citrato - dextrose (ACD) (anti-coagulante para glóbulos de ganso)

Acido cítrico (H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) 4,0 g  
Citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2 H<sub>2</sub>O) 11,26 g  
Dextrose 11,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p. 500 ml

Autoclavar a 10 libras por 10 minutos.

##### 3. 1. 3. Dextrose - gelatina- veronal (DGV) (lavagem e suspensão de glóbulos de ganso)

Dextrose 10,0 g  
Salina veronal 5 x concentrada 200 ml  
Gelatina 0,6 g  
H<sub>2</sub>O destilada e demineralizada q.s.p. 1000 ml

Autoclavar a 10 libras por 10 minutos.

Preparo: a gelatina é dissolvida em 300 ml de água quente. Esta solução é combinada com outros reagentes. Esterilizar por autoclavação, 10 minutos a 10 libras de pressão.

##### 3. 1. 4. Soluções-estoque A, B, C, D, E

###### 3. 1. 4. 1. Solução A: 1,5 M de Cloreto de Sódio

Cloreto de Sódio (NaCl) 87.65 g  
H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p. 1000 ml

###### 3. 1. 4. 2. Solução B: 0,5 M de Acido Bórico

Acido Bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 30.92 g  
H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada quente\* 700 ml  
H<sub>2</sub>O destilada e desmineralizada q.s.p. 1000 ml

\* deixa-se a solução esfriar à temperatura ambiente.

3. 1. 4. 3. Solução C: Hidróxido de Sódio concentrado (18 N)

|   |        |
|---|--------|
| Hidróxido de Sódio (NaOH)                           | 500 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 500 ml |

A mistura é agitada repetidamente para favorecer a dissolução, deixando-se esfriar à temperatura ambiente e arrolhando-se bem o frasco. A turvação da solução deve sedimentar até que o sobrenadante fique claro, o que requer um certo número de dias. A solução clara, é aspirada do sedimento e guardada num frasco tipo pyrex escuro com rolha de borracha. A solução concentrada de NaOH cerca de 18N, permanece inalterada indefinidamente.

3. 1. 4. 4. Solução D: 0,5 M de Fosfato dibásico de Sódio

|   |         |
|---|---------|
| Fosfato dibásico de Sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , anidro) | 70.99 g |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p.                   | 1000 ml |

3. 1. 4. 5. Solução E: 1.0 M de Fosfato monobásico de Sódio

|  |          |
|--|----------|
| Fosfato monobásico de Sódio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O) | 138.01 g |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p.                              | 1000 ml  |

3. 1. 5. Solução tamponada de borato salina pH 9,0

|   |         |
|---|---------|
| Solução A (1.5M de NaCl)                            | 80 ml   |
| Solução B (0.5M de H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) | 100 ml  |
| Solução C* (1N de NaOH)                             | 24 ml   |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 1000 ml |

\* Diluir a concentrada (18N) 18 vezes = 1 ml da solução C + 17 ml de água destilada e desmineralizada.

3. 1. 6. Albumina bovina (Fração V) 4 % em pH 9,0

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Albumina bovina (fração V)  | 4.0 g  |
| Borato salina pH 9.0 q.s.p. | 100 ml |

3. 1. 7. Albumina bovina 0,4 % em pH 9,0

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Albumina bovina 4 % em pH 9,0 | 100 ml |
| Borato salina pH 9,0          | 900 ml |

3. 1. 8. Sacrose a 8,5 %

|   |        |
|---|--------|
| Sacarose  | 8.5g   |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 100 ml |

3. 1. 9. Soluções para pH's 6.0 e 7.0

| Soluções-estoque   | pH 6.0  | pH 7.0  |
|--|---------|---------|
| A (1.5M de NaCl)   | 100 ml  | 100 ml  |
| D (0.5M de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                  | 32 ml   | 240 ml  |
| E (1.0M de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O) | 184 ml  | 80 ml   |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p.            | 1000 ml | 1000 ml |

Obs.: A solução para pH 6,0, é guardada no refrigerador a 4° C, enquanto a do pH 7,0, é guardada à temperatura ambiente, uma vez que no refrigerador pode cristalizar.

Tabela de valores de pH's\*

| pH final | pH 6.0 | pH 7.0 |
|----------|--------|--------|
| 6.0      | 10     | 0      |
| 6.1      | 9      | 1      |
| 6.2      | 8      | 2      |
| 6.3      | 7      | 3      |
| 6.4      | 6      | 4      |
| 6.5      | 5      | 5      |
| 6.6      | 4      | 6      |
| 6.7      | 3      | 7      |
| 6.8      | 2      | 8      |
| 6.9      | 1      | 9      |
| 7.0      | 0      | 10     |

\* volume 10ml.

### 3. 2. Soluções utilizadas no teste de fixação do complemento

#### 3. 2. 1. Alsever (Anticoagulante para sangue de carneiro)

|  |         |
|--|---------|
| Dextrose   | 20,5 g  |
| Citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 8,0 g   |
| Acido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )                | 0,55 g  |
| Cloreto de sódio (NaCl)  | 4,2 g   |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p.  | 1000 ml |

Autoclavar 10 minutos a 10 libras de pressão. Guardar a 4° C.

#### 3. 2. 2. Solução estoque de veronal tamponaa (5 vezes concentrada)

|  |         |
|--|---------|
| Acido barbital                                   | 2875 g  |
| Barbital de sódio                                | 1875 g  |
| NaCl   | 42500 g |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada     | 1000 ml |
| $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,840 g |
| $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,140 g |

O pH final é 7,2. Guardar a 4° C.

#### 3. 2. 3. Veronal diluido

|  |        |
|--|--------|
| Veronal 5 x concentrado                      | 100 ml |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada | 400 ml |

### 3. 3. Soluções para o teste de imunofluorescência

#### 3. 3. 1. PBS pH 7,5 0,01 M concentrada 10 x

|   |         |
|---|---------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                           | 12,36 g |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 1,80 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 1000 ml |

#### 3. 3. 2. PBS pH 7,5 solução para uso

|   |         |
|---|---------|
| Sol. concentrada 10 x                               | 100 ml  |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 1000 ml |

Obs.: Ajustar o pH com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N se necessário.

## 3. 3. 3. Glicerol tamponado pH 7,5

|            |           |
|------------|-----------|
| PBS pH 7,5 | 1 volume  |
| Glicerol   | 9 volumes |

3. 4. Soluções e meios usados em culturas de tecidos: *Aedes albopictus* clone C6 / 36

## 3. 4. 1. Meio L15 modificado

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| Meio L15 com glutamina (em pó)        | 13,36 g / l  |
| Triptose fosfato a 2,95 %             | 100 ml / l   |
| Solução de aminoácidos não essenciais | 10 ml / l    |
| Penicilina                            | 10000 u / l  |
| Estreptomicina                        | 10000 µg / l |
| Soro bovino fetal                     | 50 ml / l    |

Obs.: para o meio L15 "Manutenção" a quantidade de soro bovino fetal decresce para 20 ml / l

3. 4. 2. Solução de albumina bovina a 0,75 % com antibióticos: ver fórmula acima nas soluções do teste IH.

## 3. 5. Soluções e meios usados em culturas de tecidos: Células VERO

## 3. 5. 1. Meio MEM de Eagle completo

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| Meio MEM de Eagle                     | 9,7 g / l  |
| bicarbonato de sódio                  | 1,5 g / l  |
| soro bovino fetal                     | 100 ml / l |
| L-glutamina 200 mM                    | 20 ml / l  |
| HEPES solução 1 M                     | 10 ml / l  |
| Penicilina G cristalina 100000 u / ml | 1 ml / l   |
| Estreptomicina 100000 µg / ml         | 1 ml / l   |
| Fungison 500 µg / ml                  | 0,6 ml / l |

## 3. 5. 2. Solução de Tripsina concentrada (2,5 %)

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Tripsina 1:250 solução        | 25,0 g  |
| Solução de NaCl 0,85 % q.s.p. | 1000 ml |

## 3. 5. 3. Solução de tripsina 0,25 %

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Tripsina 2,5 %              | 100 ml |
| Solução de Dulbecco diluída | 900 ml |
| EDTA 5 %                    | 50 ml  |

## 3. 5. 4. Solução de Dulbecco 10 x concentrada

|   |            |
|---|------------|
| NaCl  | 80 g / l   |
| KCl   | 2 g / l    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 11,5 g / l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 2 g / l    |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 1000 ml    |

## 3. 5. 5. EDTA 5 %

|                   |         |
|-------------------|---------|
| EDTA              | 50 g    |
| PBS pH 7,5 q.s.p. | 1000 ml |

## 3. 6. Soluções para testes de ELISA

## 3. 6. 1. PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,4

|      |       |
|------|-------|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl  | 0,2 g |

|   |         |
|---|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,14 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)           | 0,91 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 1000 ml |

## 3. 6. 2. Tampão carbonato (0,1 M) pH 9,6

|   |         |
|---|---------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                     | 1,59 g  |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 2,39 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada e desmineralizada q.s.p. | 1000 ml |

## 3. 6. 3. Albumina bovina 4 % em PBS pH 7,4

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Albumina Bovina (Fração V) | 4,0 g  |
| PBS pH 7,4                 | 100 ml |

## 3. 6. 4. Tratamento do soro humano normal (SHN)

- a) 10 ml de soro ou plasma a ser extraído é colocado em um Beaker de 2000 ml.
- b) 50 volumes de acetona (500 ml) são adicionados e misturados sob agitação à temperatura ambiente.
- c) A mistura é colocada em repouso "overnight" com o Beaker inclinado (cerca de 45°). As proteínas sedimentam no menor ângulo.
- d) O sobrenadante é decantado (ou removido por aspiração).
- e) Mesmo procedimento usado no b)
- f) Mesmo procedimento usado no c)
- g) Mesmo procedimento usado no d)
- h) O sedimento é espalhado uniformemente na parede do Beaker, que em seguida deve ser colocado em posição inclinada (aproximadamente 45°); após alguns minutos a acetona acumulada é cuidadosamente aspirada e o sedimento é novamente espalhado. Esta operação é repetida várias vezes até a retirada completa da acetona restante.
- i) Deixa-se o Beaker em temperatura ambiente, por cerca de 3 h para total evaporação da acetona (o sedimento toma o aspecto de uma película transparente, revestindo a parede do Beaker).
- j) As proteínas extraídas são hidratadas adicionando 2 vezes o volume de soro ou plasma com PBS pH 7,4 (20 ml). Agita-se manualmente com movimentos circulares (lavando a parede do Beaker) várias vezes, para facilitar a hidratação.
- k) Repouso em geladeira por 1 h.
- l) Centrifugar para clarificar em centrífuga refrigerada, 15 min a 8000 rpm.
- m) Decantar e distribuir em alíquotas. Estocar a - 20° C.

## 3. 6. 5. SHN a 20 % em PBS pH 7,4

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| SHN (tratado por acetona) | 20 ml  |
| PBS pH 7,4 q. s. p.       | 100 ml |

Tabela 1: Locais, horários, aparelhos e iscas para coleta de vetores potenciais de Dengue ou Febre amarela no Brasil.

| Mosquitos/<br>Estágio                                     | Local              | Horário      | Aparelho                   | Isca                                 |
|---|--------------------|--------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <i>Aedes aegypti</i> (Dengue e Febre amarela urbana)      |                    |              |                            |                                      |
| fêmeas  | doméstico          | 10 h - 17 h  | tubos, aspirador, puçá     | humana                               |
| machos  | doméstico          | 10 h - 17 h  | tubos, aspirador, puçá     | humana                               |
| larvas  | dom., peridom.     | -            | concha, bandeja,<br>pipeta | criadouros artif.<br>criad. naturais |
| ovos  | dom., peridom.     | -            | armadilha de postura       | criadouros artif.<br>criad. naturais |
| -----   |                    |              |                            |                                      |
| <i>Aedes albopictus</i> (Dengue e Febre amarela urbana ?) |                    |              |                            |                                      |
| fêmeas  | peridoméstico      | 10 h - 17 h  | tubos, aspirador, puçá     | humana                               |
| machos  | peridoméstico      | 10 h - 17 h  | tubos, aspirador, puçá     | ?                                    |
| larvas  | peridoméstico      | 0 - 24 h (!) | concha, bandeja,<br>pipeta | criadouros artif.<br>criad. naturais |
| ovos  | peridoméstico      | 0 - 24 h (!) | armadilha de postura       | criadouros artif.<br>criad. naturais |
| -----   |                    |              |                            |                                      |
| <i>Haemagogus janthinomys</i> (Febre amarela silvestre)   |                    |              |                            |                                      |
| fêmeas  | copa da floresta   | 10 h - 15 h  | tubos, aspirador, puçá     | humano, macaco                       |
| machos  | ?                  | ?            | ?                          | ?                                    |
| larvas  | buracos de árvores |              | concha, pipeta             | criad. naturais                      |
| ovos  | buracos de árvores |              | armadilha de postura       | criad. naturais                      |

**Tabela 2: Dados a serem preenchidos na ficha epidemiológica acompanhando a amostra de sangue humano.**

---

**DADOS GERAIS**

- 1) Nome, endereço, nº de telefone e fax da instituição;
- 2) Nome completo e cargo do investigador;
- 3) Data da investigação; Data da hospitalização; Data do falecimento;

.....

**DADOS DE REGISTRO**

- 4) Número da ficha; Número de campo da amostra;
- 5) Dados pessoais do paciente: nome completo, sexo, data e lugar de nascimento, profissão, residência atual (cidade, município, estado, país), residência anterior, em caso de mudança recente (cidade, município, estado, país);

.....

**DADOS CLINICOS**

- 6) **perguntar objetivamente (para análise estatística) ao paciente se ele teve :** febre, calafrio, cefaléia, tonteira, fotofobia, náuseas, vômitos, dores epigástricas, dores musculares, dores articulares, oligúria ou anúria, hematúria, melena, hematótese, icterícia, congestão cutânea, congestão conjuntival, icterícia, coriza, coma, rigidez de nuca, diplopia, dispneia, diarréia ou obstipação, tosse, gânglios palpáveis, exantema, etc...;
- 7) **solicitar ao paciente para o mesmo, sempre que possível, descrever os sintomas:** data e modo do início, evolução, duração, etc...

.....

**DADOS LABORATORIAIS**

- 8) natureza do material colhido com números associados: sangue total, soro, urina, fezes, fígado, coração, rim, baço, cérebro, outros;
- 9) resultados de exames complementares: provas de função hepática (bilirrubinas, transaminases, fosfatase alcalina), eletroforese das proteínas, uréia, creatinina, hemoscopia (pesquisa de *Plasmodium*), hemograma completo, hemossedimentação, coagulograma, etc...

.....

**DADOS CONCLUSIVOS**

- 10) Diagnóstico e anotações do médico responsável pelo inquérito.
-

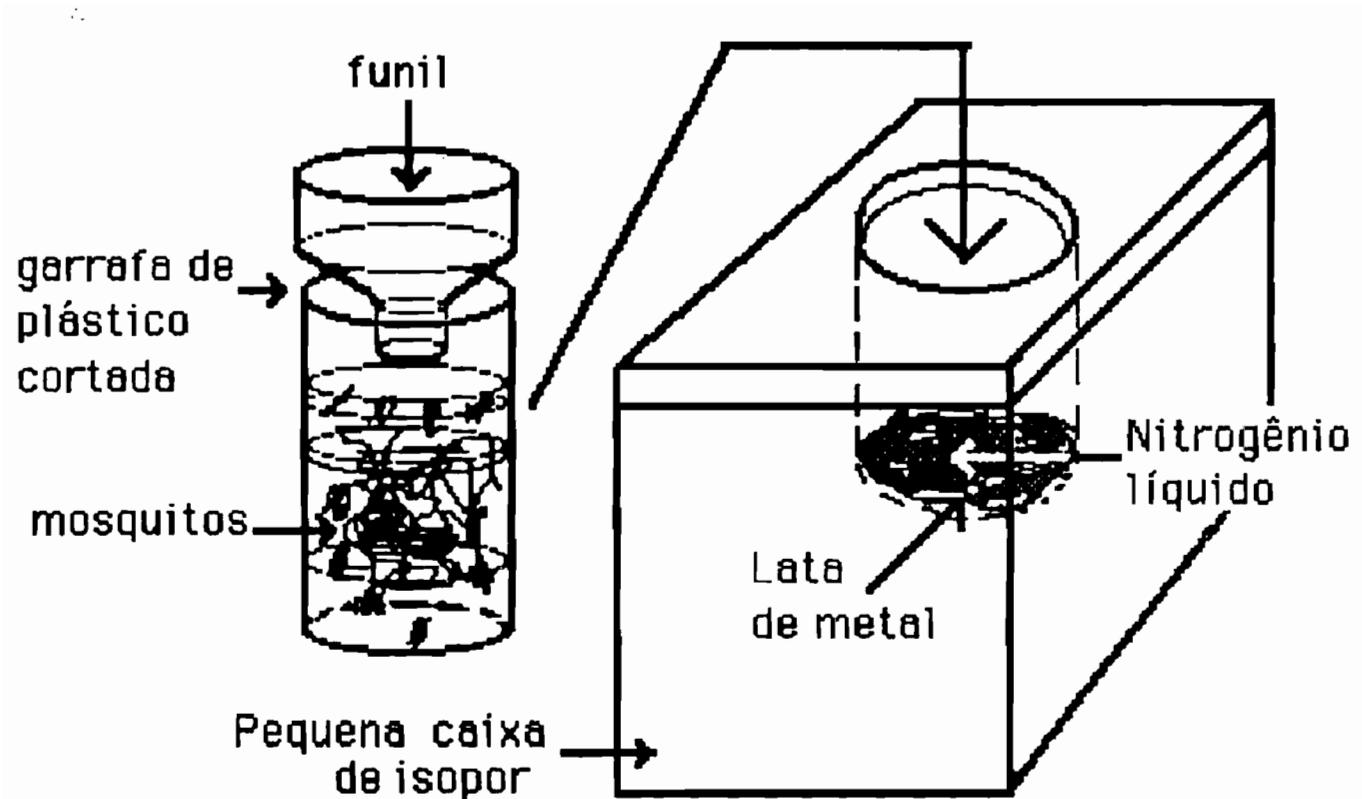


Fig. 1. Dispositivo para matança de mosquitos a frio.

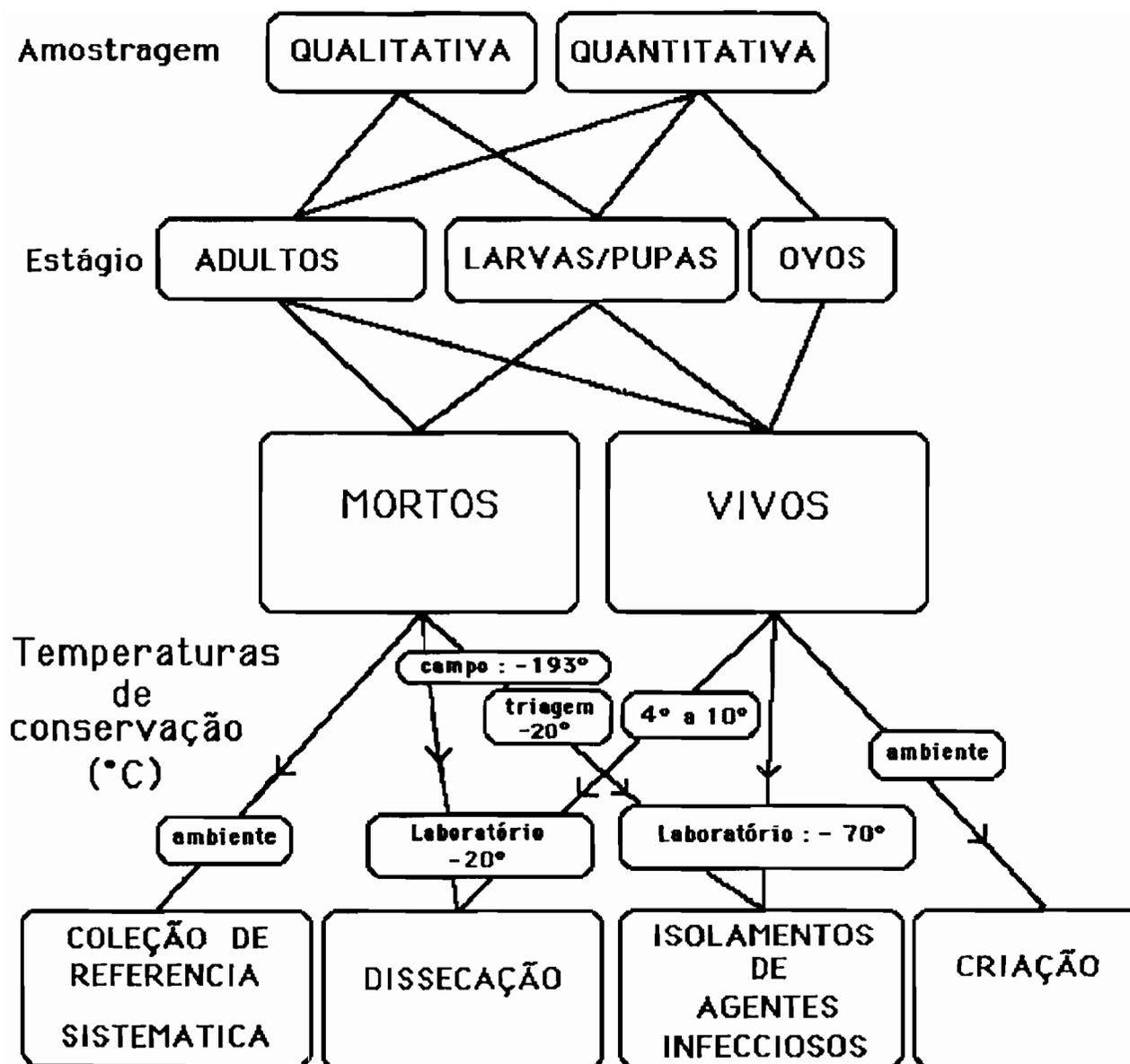


Fig. 2. Modos de conservação das amostras de vetores potenciais, segundo os objetivos de estudo.

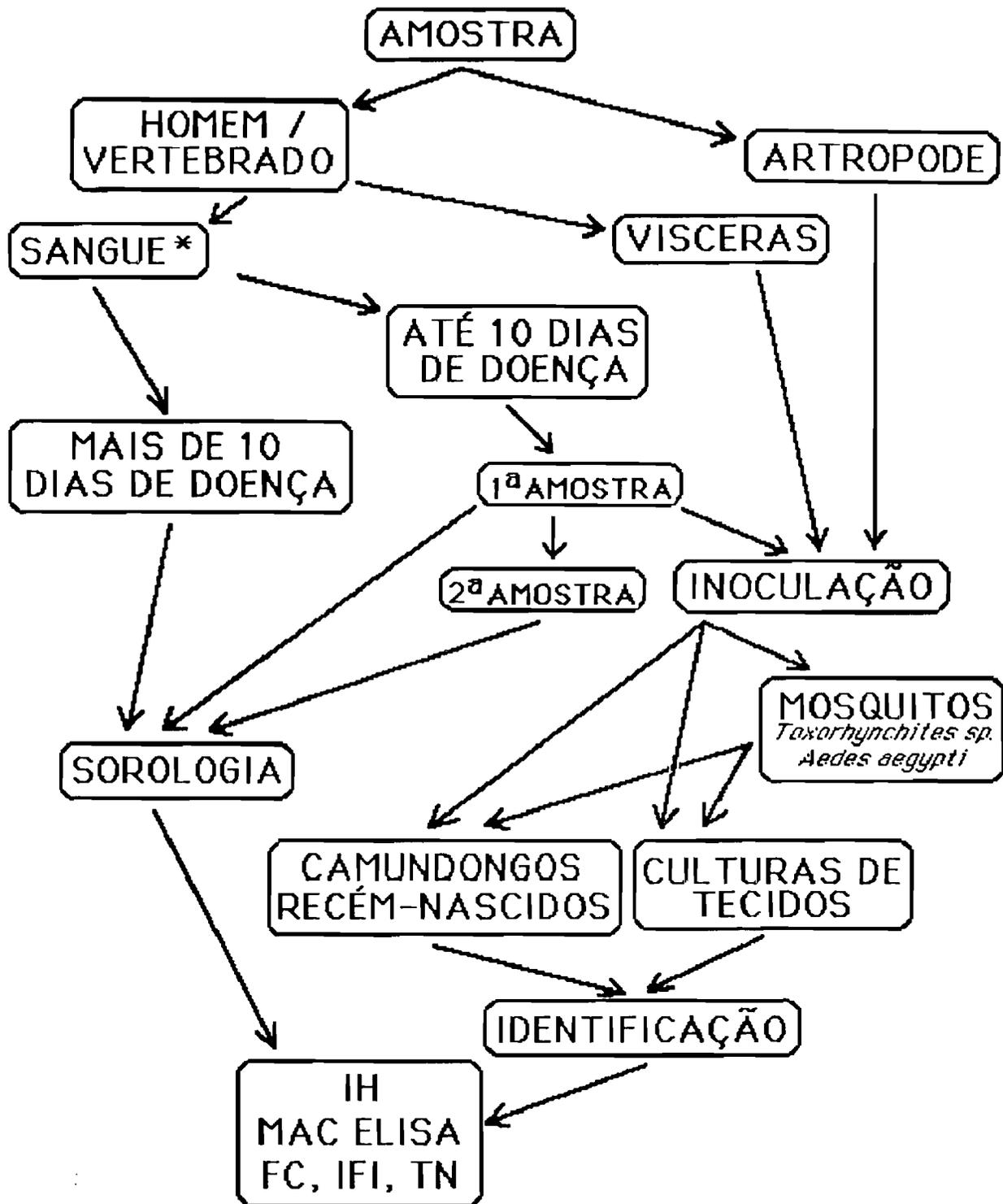


Fig. 3. Estudos virológicos e sorológicos, de acordo com a natureza das amostras; \* o sangue de animais silvestres é sempre inoculado para tentativa de isolamento.

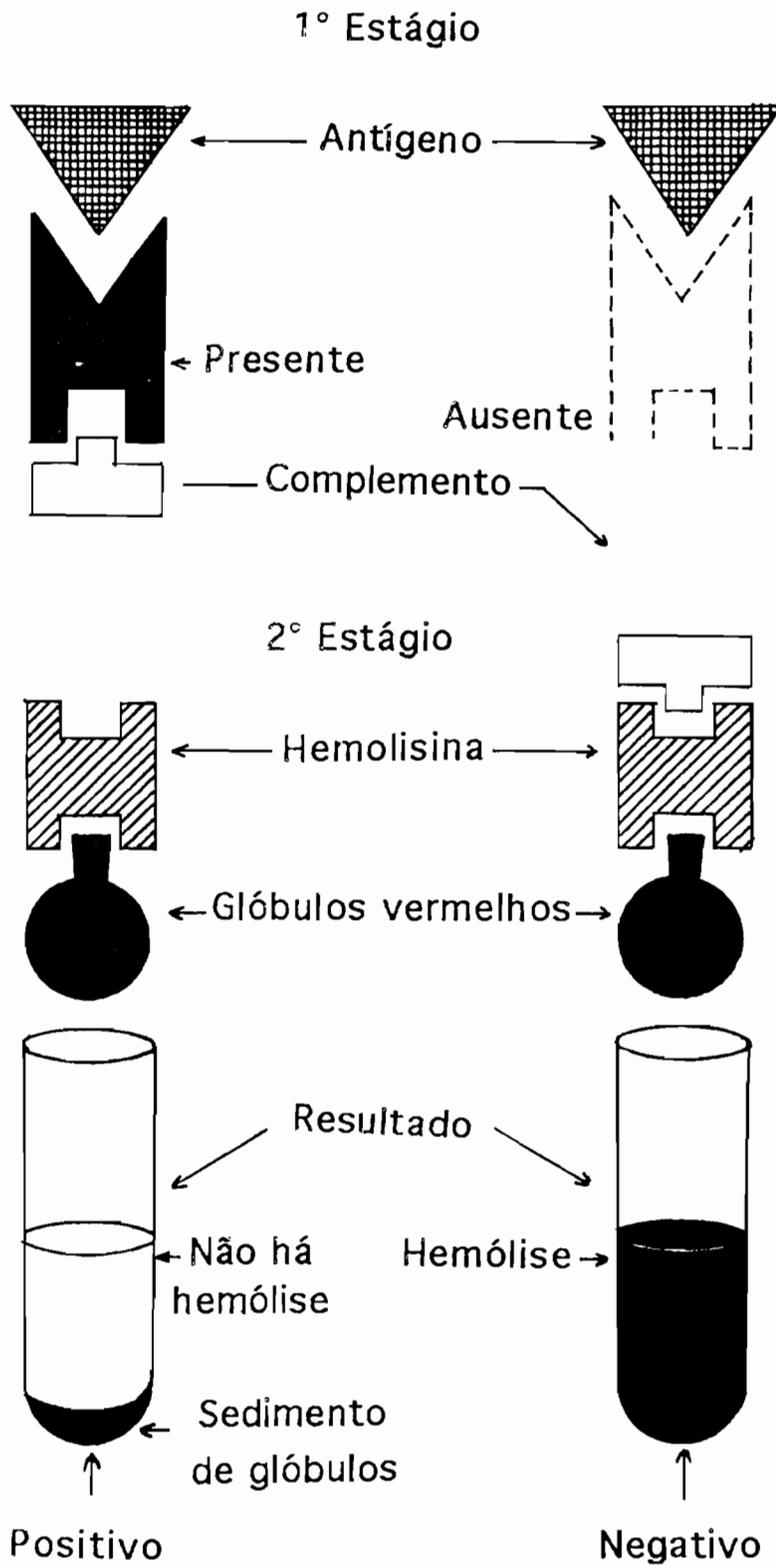


Figura 4: Esquema do teste de fixação do complemento.

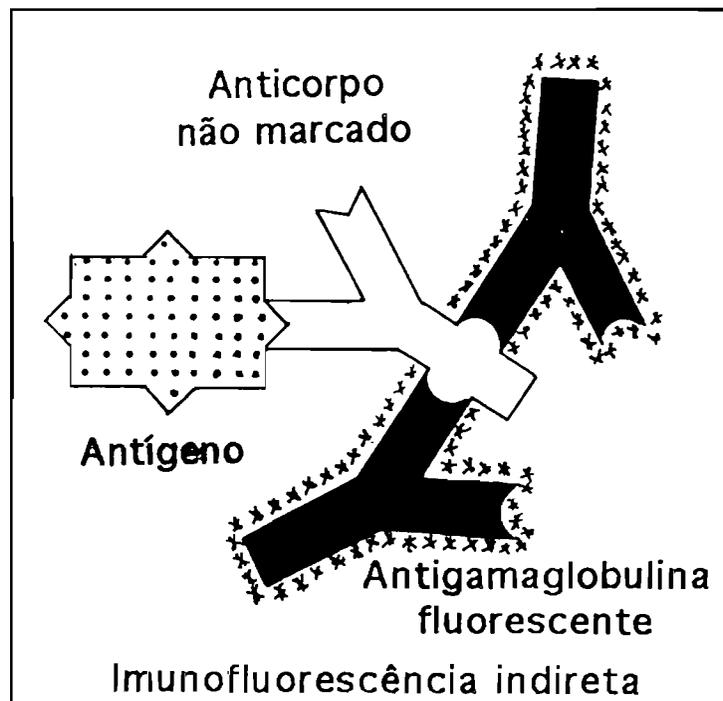
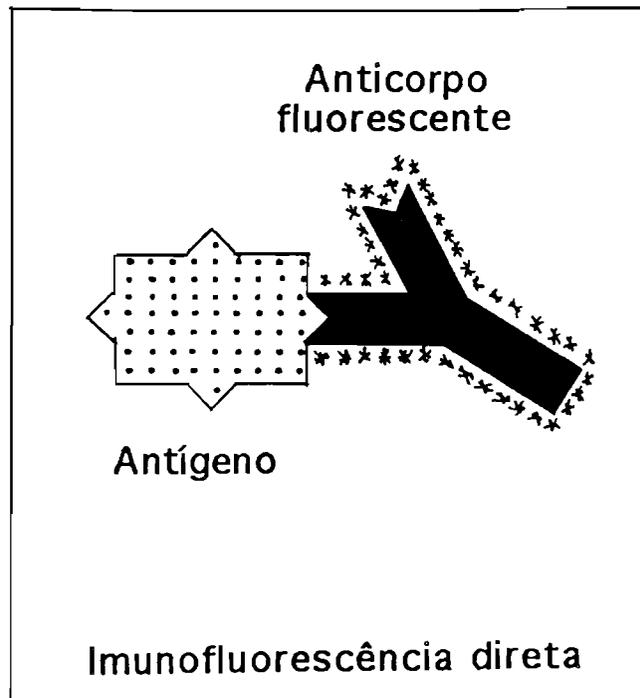
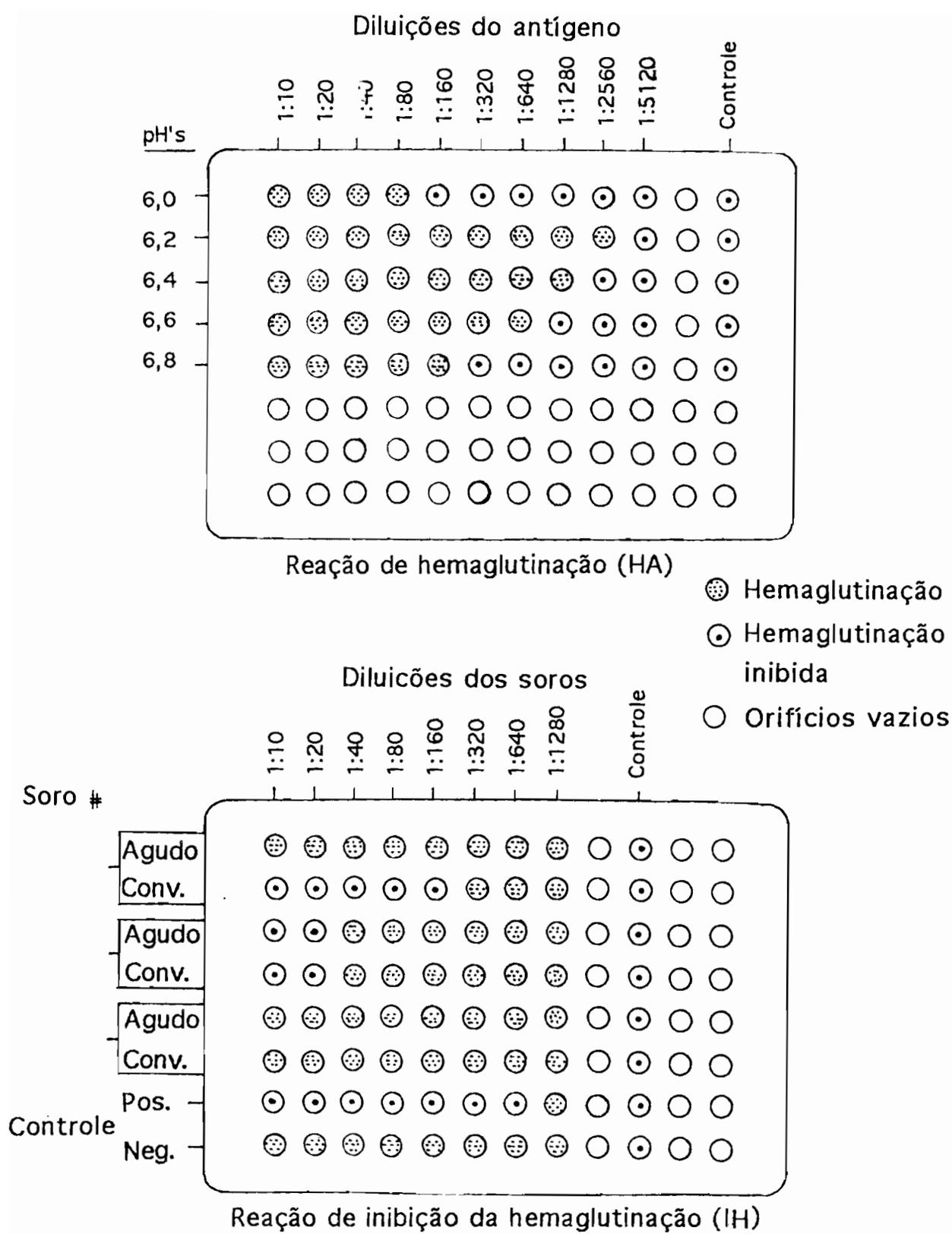


Figura 5: Esquemas das técnicas direta e indireta de imunofluorescência



**Figura 6: Placas com testes de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação .**

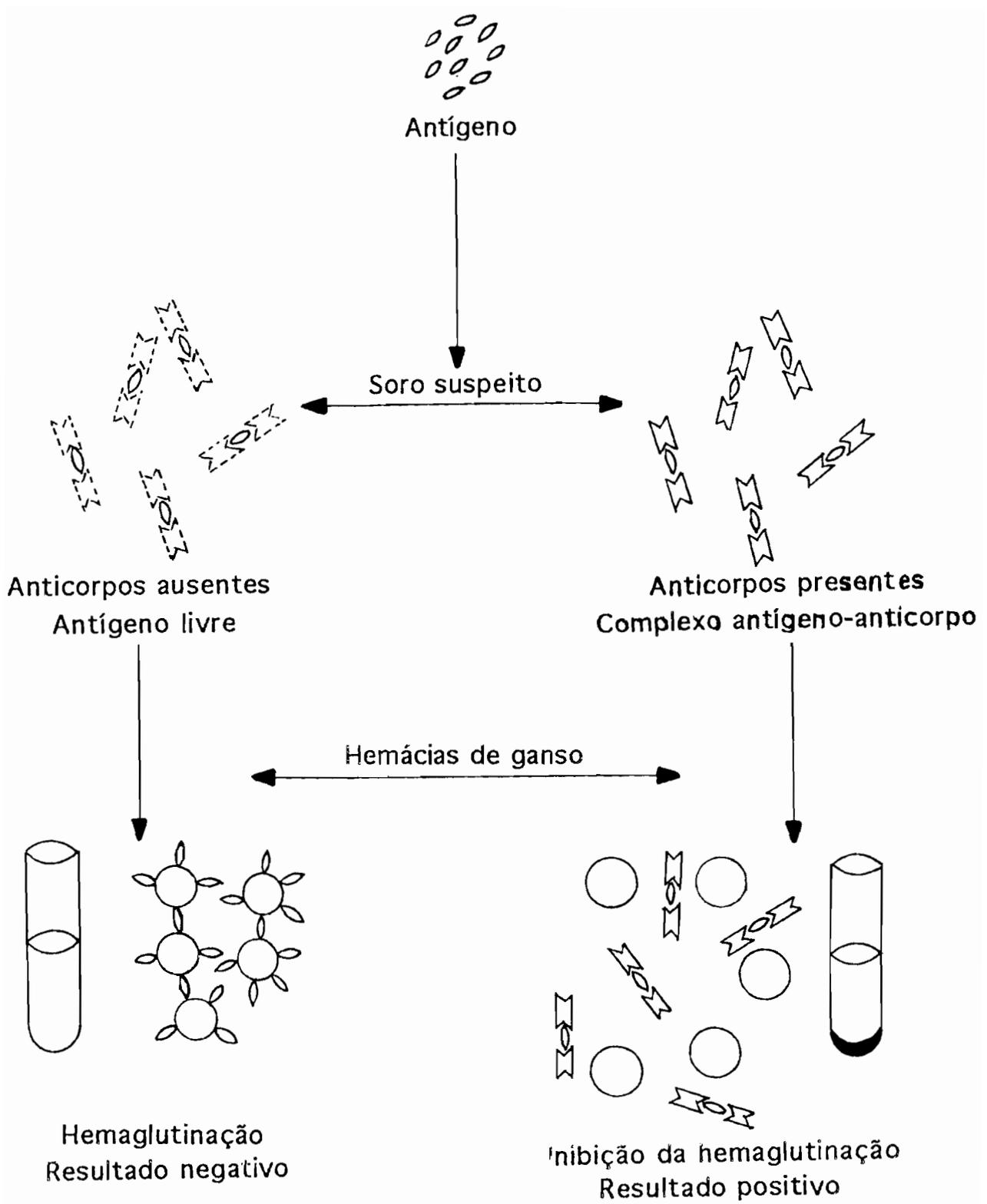
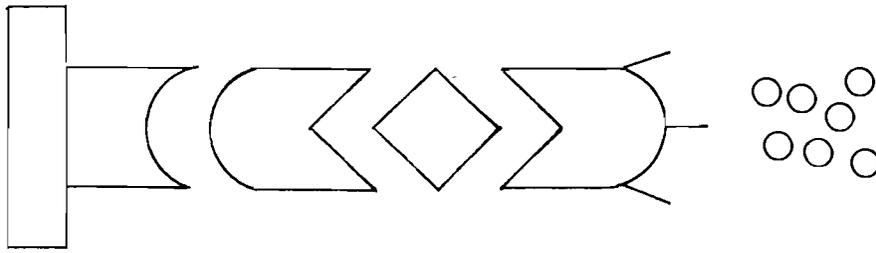
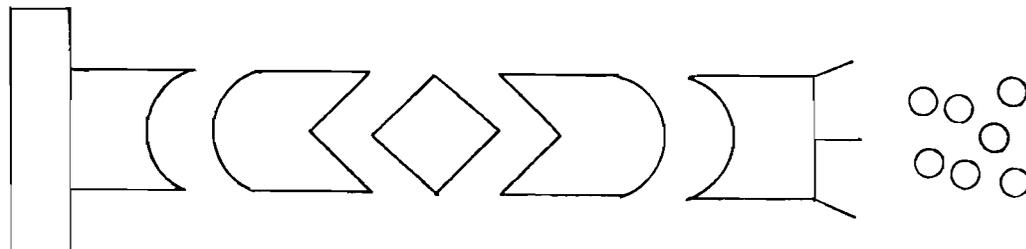


Figura 7: Esquema do teste de inibição da hemaglutinação, mostrando reação negativa e reação positiva.



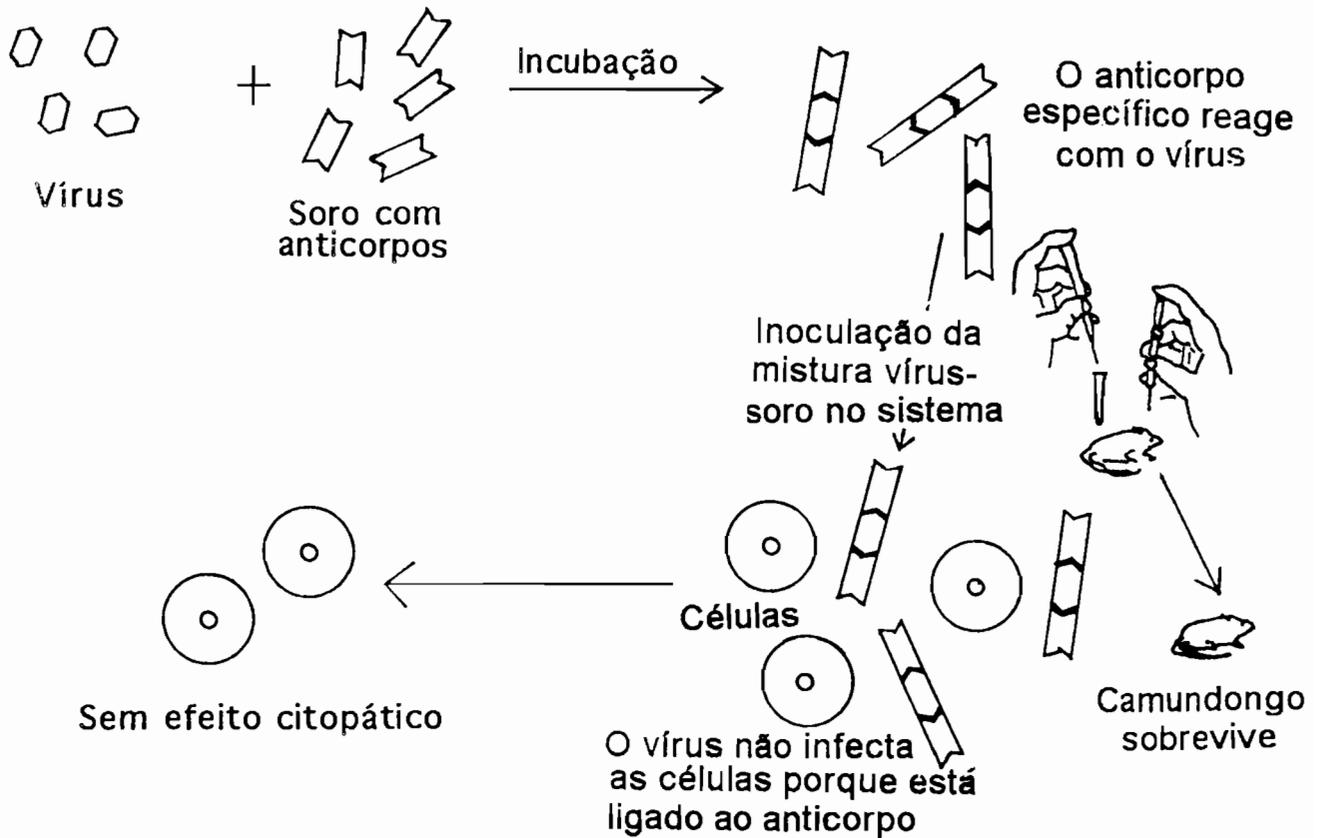
- 1) Placa
- 2) Anti IgM humana adsorvida à placa (anticorpo de captura)
- 3) Anticorpo (soro do paciente e controles do teste)
- 4) Antígeno (Dengue, Febre amarela ou Rocio)
- 5) Conjugado anti flavivírus (anticorpos marcados com peroxidase)
- 6) Substrato (ABTS)



- 1) Placa
- 2) Anti IgM humana adsorvida à placa (anticorpo de captura)
- 3) Anticorpo (soro do paciente e controles do teste)
- 4) Antígeno (Mayaro, Oropouche ou VEE)
- 5) Anticorpo (FAI de camundongo anti o antígeno investigado)
- 6) Conjugado anti-camundongo (anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase)
- 7) Substrato (ABTS)

**Figura 8: Esquema do teste imunoenzimático para captura de IgM (MAC ELISA).**

### Neutralização



### Sem neutralização

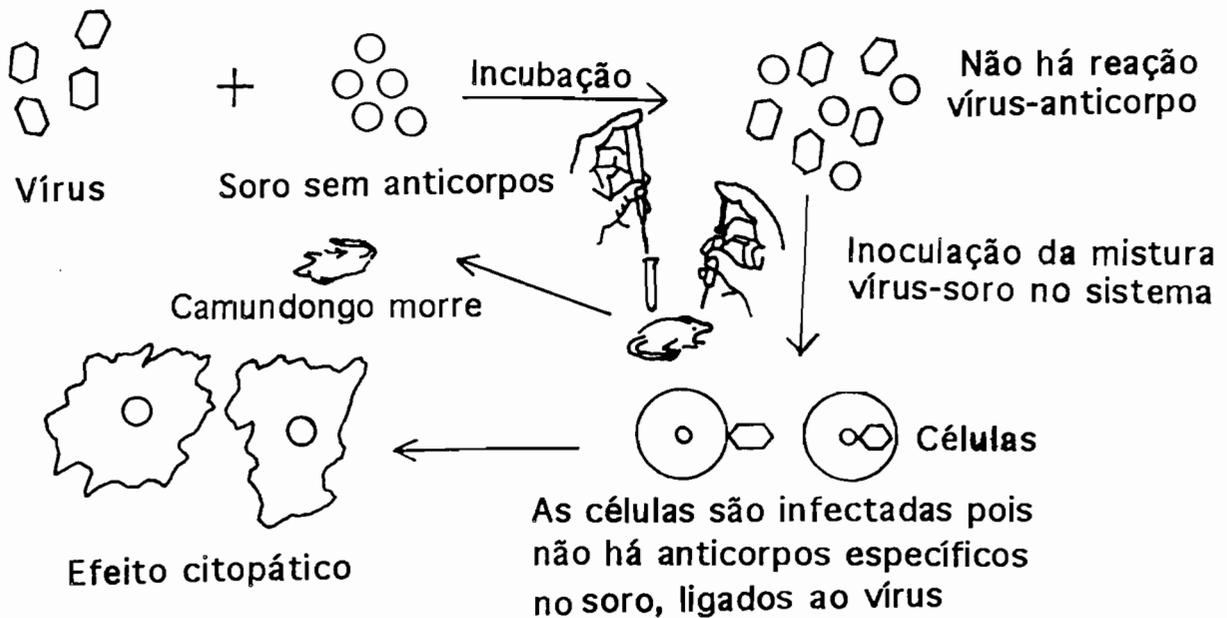


Figura 9: Esquema do teste de neutralização em células e em camundongos recém nascidos, mostrando uma reação de neutralização (A) e outra sem neutralização (B).