

DETECÇÃO DE VÍRUS DENGUE SOROTIPOS 1 E 2 PELA TÉCNICA DE IMMUNOBLOTTING UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Maria Luisa BARBOSA¹
Júlia Maria M. SOUZA-FELIPPE¹
Benedito A. FONSECA²
Peter N. MANSON³
Ivani I. B. FERREIRA¹
José Antonio JEREZ⁴

RIALA 06/8774

BARBOSA, M. L. et al. — Detecção de vírus Dengue sorotipos 1 e 2 pela técnica de imunoblotting utilizando proteínas recombinantes. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 121-127, 1999

RESUMO: Os vírus dengue são patógenos que vêm afetando milhões de pessoas durante os dois últimos séculos. No presente trabalho, comparou-se a técnica tradicional de MAC-ELISA e o teste de *Immunoblotting*, utilizando-se proteínas recombinantes, para pesquisa de anticorpos da classe M, contra os vírus Dengue sorotipos 1 e 2. Foram testadas 100 amostras de soro de pacientes, com suspeita clínica de dengue, por MAC-ELISA e *Immunoblotting*. Estes soros quando submetidos ao MAC-ELISA resultaram 56 positivos para dengue e 44 negativos. Estas mesmas amostras avaliadas por *Immunoblotting* revelaram 56 soros negativos, 36 soros positivos para DEN-1, 6 para DEN-2 e 2 para DEN-1 e 2.

Proteínas recombinantes (DEN-1 e DEN-2) utilizadas como antígeno em *Immunoblotting* possibilitam um diagnóstico diferencial dos sorotipos de dengue circulantes em determinada área, enquanto o teste de MAC-ELISA apesar de sensível e rápido não tipifica o sorotipo de dengue, dado importante durante os períodos de epidemias.

DESCRITORES: Dengue, MAC-ELISA, *Immunoblotting*, proteínas recombinantes

1. INTRODUÇÃO

Os vírus Dengue vêm infectando milhões de pessoas durante os dois últimos séculos. A história natural da doença está ligada ao meio ambiente e a hábitos domésticos da população. São transmitidos principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, porém outros *Aedes* ssp, encontrados nos trópicos, são vetores potenciais e

mais da metade da população humana está exposta à picada destes artrópodos. Na maioria dos casos de infecção, ocorre a febre do dengue clássico ou a febre indiferenciada, porém a febre hemorrágica do dengue pode acontecer evoluindo para choque (síndrome de choque), ocasionando morte do paciente^{9,11}.

Os vírus Dengue são arbovírus que pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Até o momento

1 Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Luz, Laboratório Central

2 Professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

3 Yale University School of Medicine, Yale Arbovirus Research Unit, Department of Epidemiology and Public Health, New Haven, CT, USA

4 Professor da Faculdade de Medicina Veterinária, USP

são conhecidos quatro sorotipos distintos do vírus Dengue: sorotipo 1 (DEN-1), sorotipo 2 (DEN-2), sorotipo 3 (DEN-3) e sorotipo 4 (DEN-4). A exemplo de outros flavivírus apresentam envelope, nucleocapsídeo e genoma formado por um RNA de fita simples, senso positivo e aproximadamente 11 kb^{4,21,29,30}. Um aspecto importante do genoma destes vírus é a presença de uma estrutura conhecida como *Open Reading Frame* (ORF). Este ORF é responsável pela codificação de uma poliproteína, a qual é processada em 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais⁴. Entre as três proteínas estruturais (core [C], membrana [M] e envelope [E]) a proteína E tem um papel importante na biologia do vírus uma vez que é responsável por várias atividades biológicas incluindo montagem do vírus (maturação), fusão celular e imunogenicidade induzindo anticorpos neutralizantes e de anticorpos inibidores da hemaglutinação^{13,26}.

O mapa topológico da proteína E revelou vários domínios antigênicos, entretanto três (domínio I, II e III) foram definidos como principais, sendo cada um composto de vários epítomos que exibem diferentes atividades funcionais e sorológicas^{13,14,17,19,22,23}.

O domínio II da proteína E contém um fragmento de aproximadamente 100 aminoácidos, com vários resíduos de cisteína, os quais são importantes na preservação da ponte dissulfídica N-terminal, responsável pela estrutura conformacional dos sítios antigênicos. A partir dessa seqüência de aminoácidos foram produzidas proteínas recombinantes dos vírus da encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus - JEV) e DEN-1 que podem ser empregadas como antígenos em reações sorológicas^{18,19}.

Proteínas E recombinantes para a região do domínio II dos sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 foram produzidas e testadas em suas reatividades com fluido ascítico de camundongos imunizados, utilizando-se os ensaios imunoenzimáticos tipo ELISA⁸.

No presente trabalho, a partir de soros de pacientes com suspeita clínica de dengue, estudou-se a resposta imune humoral de anticorpos da classe M pela técnica tradicional de MAC-ELISA e comparou-se os resultados com o teste de *immunoblotting* realizado com proteínas E recombinantes dos sorotipos DEN-1 e DEN-2.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de Soro

Amostras de soro foram obtidas de 100 pacientes, após 5 dias ou mais do início dos sintomas da doença. Os soros eram de pacientes procedentes de diferentes regiões geográficas do Brasil: São Paulo, Alagoas e Mato Grosso do Sul e foram enviadas para a Seção de Vírus

Transmitidos por Artrópodos para diagnóstico sorológico de infecção pelo vírus Dengue. Amostras do Estado de São Paulo foram enviadas por Centros de Saúde, Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz e Serviços de Vigilância Epidemiológica. Os soros procedentes de Alagoas e Mato Grosso do Sul foram enviados pelo Laboratório Central de Saúde (LACEN) de cada Estado. As amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante e os soros foram separados por centrifugação (10 min. a 2000 rpm), acondicionados em frascos, identificados e armazenados a -20 °C. As amostras, de Alagoas e Mato Grosso do Sul, foram enviadas, após separação dos soros, em caixas de isopor com gelo comum ou gelo seco e também mantidas a -20°C até serem analisadas pelas técnicas propostas neste estudo.

2.2. Antígenos

Os antígenos foram preparados pela Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos (Instituto Adolfo Lutz), a partir de cérebro de camundongos albinos *swiss*, de dois ou três dias de idade, por extração com sacarose - acetona e titulação por hemaglutinação, com hemácias de ganso⁷. A diluição que corresponde a 16 unidades hemaglutinantes foi utilizada para a realização da técnica de MAC-ELISA.

2.3. Proteínas E recombinantes

E. coli transformadas, contendo parte do genoma da proteína E, inserido em plasmídeo pATH 3DNA, foram gentilmente cedidas pelos Drs. Benedito A.L.Fonseca e Peter Mason (Yale University School of Medicine, Yale Arbovirus Research Unit, department of Epidemiology and Public Health, New Haven, CT, USA). Os recombinantes utilizados foram D₁E₁, D₁E₂, D₂E₁ e D₂E₂. A diferença entre E₁ e E₂ esta na presença do aminoácido cisteína em E₁, responsável pela formação da ponte dissulfídica do segmento II da proteína E.

As bactérias *E. coli* transformadas foram crescidas em meio M₉ formulado segundo Sambrook et al²⁴, na presença ou ausência de triptofano, para produção das proteínas recombinantes. Após tratamento com lisozima e NaCl a 5M foi obtido um sedimento amarelado contendo as proteínas recombinantes que foram ressuspensas em 1 mL de tampão TRIS/SBU (10mM TRIS, 1% SDS (*Sodium Dodecil Sulphate*), 1% β -mercaptoethanol, 6M úrea, pH 7,2) (MASON et al 1989) e então estocadas a -20°C até o uso.

2.4. MAC-ELISA

O MAC-ELISA foi realizado, segundo a técnica desenvolvida por KUNO et al¹⁵. A sensibilização das

microplacas (Corning, NY, USA) foi feita utilizando-se 100 µl, por orifício, de anti-IgM humano (Sigma, Chemical, St Louis, USA), específico para a cadeia, produzido em cabra, diluído a 1:240 em solução tampão carbonato 0.1M pH 9,6. As microplacas foram incubadas a 4°C em câmara úmida por 18 horas e então lavadas 5 vezes com *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,4. Uma etapa de bloqueio foi efetuada com 150 µl por orifício de PBS, contendo albumina bovina, (Sigma, Chemical, St Louis, USA), a 4%, e incubação de 30 min a temperatura ambiente. Após este período foram lavadas novamente 5 vezes com PBS e usadas imediatamente ou estocadas a -20°C até o uso.

Após lavagem, de 5 vezes com PBS, foram adicionados, por orifício, 50 µl de cada soro em teste em uma diluição de 1/40 em PBS com 0,5% de albumina bovina. A seguir as microplacas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em cada placa foram testadas 43 amostras de soro em duplicata, controles positivo e negativo. Outra etapa de 5 lavagens com PBS e 50 µl de um *pool* de antígenos DEN-1 e DEN-2, com 16 unidades hemaglutinantes de cada antígeno, diluído em PBS com 20% de soro de cavalo normal, foi adicionada em cada orifício. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Após incubação e lavagens o anticorpo monoclonal, anti-flavivírus, preparado em camundongos, marcado com peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories), utilizado na diluição de 1/2500 em PBS com 20% de soro de cavalo normal, foi adicionado (25µl em cada orifício) e as placas foram incubadas por 1h a 37°C em câmara úmida. As microplacas foram lavadas 7 vezes com PBS e seguiu-se a adição de 100µl de substrato ABTS (2,2-azino-di-(3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid) diammonium salt – marca Kirkegaard & Perry Laboratirie), composto por duas soluções: Sol. A = ABTS e Sol. B = H₂O₂ preparada em partes iguais, no momento de uso. Após incubação à 37°C/30 minutos a leitura foi realizada em leitor de ELISA Titertek Multiscan MCC a 414 nm. Não foi necessário interromper a reação para leitura.

As amostras de soro foram testadas em duplicata. O primeiro orifício denominado TESTE continha todas as etapas do MAC-ELISA tradicional como descrito acima, o segundo orifício denominado controle não continha o antígeno, apenas o diluente do mesmo. Este tipo de controle foi importante na redução de falsos positivos. Resultado positivo nos dois orifícios são considerados inespecífico. Soros positivos foram aqueles com leitura de densidade óptica (DO) maior que 0.200.

2.5. *immunoblotting*

O método usado foi o descrito por TOWBIN et al²⁷ e BURNETTE³ com algumas modificações. O extrato de

proteína E recombinante obtido foi submetido à separação em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) e transferido para membranas de nitrocelulose²². As membranas foram cortadas em tiras contendo os quatro tipos de antígenos: D₁E₁, D₁E₂, D₂E₁ e D₂E₂. Procedeu-se inicialmente o bloqueados com BSA 3%, durante 18 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente cada tira foi lavada três vezes em PBS pH 7,4 e a seguir foi adicionado o soro do paciente diluído 1:40 em BSA 1% por 2h a temperatura ambiente e constante agitação. Decorrido este período de tempo foram feitas 3 lavagens, de 10 minutos cada, em BSA 1%. As membranas foram incubadas com conjugado anti-gamaglobulina humano (IgM), produzido em cabra, ligado à peroxidase (Sigma, Chemical, St Louis, USA) e diluído 1:800 em BSA 1%. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 horas e constante agitação. As tiras foram lavadas como acima e coradas com solução de 0,5 mg/mL de 3.3.diaminobenzidina (DAB — Sigma, Chemical, St Louis, USA) com 0,1% H₂O₂ em PBS.

A sensibilidade, especificidade e eficiência, para IgM, foram calculados segundo a tabela 1 e formulas apresentadas a seguir.

Tabela 1. Formulas para os cálculos da sensibilidade, especificidade e eficiência,

MAC-ELISA Immunobl.	positivo	negativo	Total
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

1) Sensibilidade

$$S = \frac{A}{a+c} \times 100$$

2) Especificidade

$$E = \frac{D}{b+d} \times 100$$

3) Eficiência

$$Ef = \frac{a+d}{A+b+c+d} \times 100$$

3. RESULTADOS

Os soros de pacientes com suspeita clínica de dengue testados por MAC-ELISA resultaram em 56 positivos para dengue e 44 negativos. Estas mesmas amostras quando avaliadas por *immunoblotting* apresentando diferentes antígenos para a detecção de DEN-1 e DEN-2, revelaram 56 soros negativos, 36 positivos para DEN-1, 6 para DEN-2 e 2 produziram reação visível para DEN-1 e DEN-2. Entre os soros positivos pelas duas técnicas (n=40) verificou-se que 33 eram DEN-1 positivo, 5 DEN-2 positivos e 2 DEN-1 e DEN-2 positivos pela técnica de *immunoblotting*; 16 amostras foram positivas só em MAC-ELISA, não sendo possível determinar qual o sorotipo, quatro foram positivas apenas em *immunoblotting*, sendo 3 DEN-1 e 1 DEN-2 e 40 negativos para as duas provas (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado comparativo dos testes de MAC-ELISA e *immunoblotting* em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue, colhidas de pacientes a partir do 5º dia pós manifestações clínicas. São Paulo, 1995.

MAC-ELISA \ Immunoblotting	MAC-ELISA		Total
	Positivos	Negativos	
DEN-1	33	3	36
DEN-2	5	1	6
DEN-1 e DEN-2	2	-	2
Negativos	16	40	56
Total	56	44	100

Tomando os resultados de MAC-ELISA como padrão, a sensibilidade do *immunoblotting* com antígenos recombinantes para D1E1 e D2E1 foi de 71%, enquanto a especificidade e eficiência foram de 90% e 80% respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Immunoblotting é uma técnica relativamente rápida e sensível de caracterização de antígenos proteicos pois combina a separação de proteínas de diferentes pesos moleculares por eletroforese, com a identificação imunológica dessas proteínas², sendo portanto uma técnica valiosa para propósitos experimentais e informações

moleculares^{5,16}. A técnica de *immunoblotting* no diagnóstico de dengue pode identificar o sorotipo específico circulante em determinada região. CHURDBOONCHART et al⁵ usaram esta combinação para detectar imunoglobulinas M e G produzidas contra o vírus dengue, em soro de pacientes com Febre Hemorrágica e Síndrome do Choque, confirmando o diagnóstico sorológico; uma vez que MAC-ELISA, como único teste diagnóstico de rotina, para a detecção de IgM contra o vírus dengue, pode resultar em possíveis reações cruzadas intraespecífica e interespecífica, levando a resultados falsos positivos.

Várias evidências sugerem que muitos dos epítopos neutralizantes em flavivírus estão na glicoproteína E. O domínio II (aminoácidos 300 a 400) parece fazer parte dos sítios de ligação de receptores dos flavivírus¹². Analisamos os antígenos recombinantes de DEN-1 e 2, desta região, a fim de explorar as possibilidades de um diagnóstico diferencial destes dois sorotipos de dengue. Os soros dos pacientes, utilizados nas análises, foram obtidos de três diferentes regiões brasileiras: Estado de São Paulo, Estado de Alagoas e Estado de Mato Grosso do Sul, onde estes vírus são epidêmicos. Em infecções primárias por vírus Dengue, altos títulos de IgM podem ser detectados por MAC-ELISA; todavia, IgM para os polipeptídeos dos vírus DEN são ainda pouco detectáveis em *immunoblotting*. Partindo da estrutura integral do vírus, CHURDBOONCHART et al⁵ analisaram, por *immunoblotting*, soros de pacientes após infecção primária com dengue e mostraram que IgM para este vírus foram raramente e inconsistentemente detectados por SDS-PAGE/ *immunoblotting*. Nossas observações estão de acordo com estes dados, pois do total de positivos para MAC-ELISA (56) apenas 78,5% (44 de 56) foram positivos para IgM quando testados por *immunoblotting*.

Entre os casos de dengue negativos por MAC-ELISA quatro (7%) foram positivos para IgM em *immunoblotting*. Este resultado pode ser devido a falsos negativos, dentro dos 10% esperados em MAC-ELISA, segundo dados da PAHO²⁰. Já 16 casos foram MAC-ELISA positivos e “*immunoblotting*” negativos para IgM. Estes achados podem ser decorrentes de uma possível perda de reconhecimento do antígeno-anticorpo. A maioria dos epítopos das proteínas E e NS1 dos vírus MVE e TBE são sensíveis a agentes redutores^{19,15}, efeito também observado sobre algumas proteínas de vírus dengue, após tratamento com 2 β-mercaptoetanol, utilizado como agente redutor⁶.

Estes resultados podem ainda ser decorrentes de título da imunoglobulina M insuficiente para uma resposta positiva assim como da perda de intensidade de ligação da proteína E em *immunoblotting*, por prováveis alterações conformacionais dos epítopos D1E1/D1E2 e D2E1/D2E2, tornando menos acessíveis para os anticor-

pos IgM. É importante também salientar a competição entre as imunoglobulinas IgG e IgM na técnica de *immunoblotting*, o que fica reduzido no MAC-ELISA por se tratar de um método de Captura.

Ressaltamos que até o momento não foram isolados casos positivos autóctones para os sorotipos 3 e 4, nos Estados de origem das amostras de sangue analisadas. Sendo assim, futuras investigações da presença de anticorpos, para estes sorotipos do vírus da dengue, serão necessárias naquelas 16 amostras positivas só no MAC-ELISA, antes de descartarmos a possibilidade de falsos positivos e/ou a ocorrência real de alterações nos epitopos dos sorotipos estudados neste trabalho.

Estudos realizados com outros vírus descrevem que *immunoblotting* é mais eficiente que ELISA para detec-

ção de anticorpos específicos tanto para o vírus da Peste Suína Africana¹ como para o reovírus sorotipo 3²⁵. Entretanto, o uso de *immunoblotting* no diagnóstico laboratorial tem consistido apenas na confirmação dos casos positivos em ELISA. Nos casos da Peste Suína Africana muitos laboratórios de diagnóstico tem substituído a imunofluorescência por *immunoblotting*¹.

Apesar de MAC-ELISA ser um método sensível e rápido, no diagnóstico de dengue, não tipifica os sorotipos de dengue circulantes e ainda podem ocorrer reações cruzadas entre os diferentes flavivírus. Nossos estudos mostraram que os ensaios de *immunoblotting*, com proteínas recombinantes (DEN-1 e DEN-2), são qualitativas e importantes na definição do sorotipo circulante, pois resultam em respostas rápidas durante períodos epidêmicos.

RIALA 06/874

BARBOSA, M.L. et al. — Detection of dengue virus serotypes 1 and 2 by immunoblotting techniques using recombinant proteins. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 121-127, 1999.

ABSTRACT: Dengue viruses (DEN-1 to 4) are human pathogens affecting millions of people in the last two centuries. Results of a comparative study between the traditional MAC-ELISA method and the Immunoblotting techniques using recombinant proteins of DEN-1 and DEN-2 to detect virus specific class M Immunoglobulins, are reported in this paper. One hundred sera samples were studied. Fifty six samples were positive to dengue by MAC-ELISA and 44 were positive by Immunoblotting technique: 36 to DEN-1, 6 to DEN-2 and 2 to DEN-1 and 2 sorotypes. So, the serotype identification of the dengue virus circulatig in a determined area is possible by using these recombinant proteins in Immunoblotting techniques. These data are important for epidemiological surveillance mainly during the occurrence of an epidemie

Keyword: Dengue, MAC-ELISA, Immunoblotting, recombinants proteins

REFERÊNCIAS

1. ALCARAZ, C.; RODRIGUEZ, F.; OVIEDO, J.M.; EIRAS, A.; De DIEGO, M.; ALONSO, C. & ESCRIBANO, J.M.. Highly specific confirmatory Western blot test for African Swine Fever virus detection using the recombinant protein p54. *J. Virol. Methods*, 53: 111-119, 1995.
2. AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G. & STRURHL, R.E. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons, 1989.
3. BURNETTE, W.N.. "Western blotting": eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiated protein A. *Anal. Biochem.*, 112: 195-203, 1981.
4. CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M., Flavivirus genome organization expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44: 649- 688, 1990.
5. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. & SIRINAVIN, S.. Antibodies Against Dengue viral proteins in primary and Secondary Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 481-493, 1991.
6. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. PINTHONG, C.; SIRINAVIN, S. & CHAIYOTHA, A.. Antibodies

- to dengue viral polypeptides. I. Sensitivity and specificity of the viral-antigen-strips/ enzyme immunoassay. *South. Asian J. Trop. Med. Public Health*, 18: 362-372, 1987.
7. CLARKE, D.H. & CASALS, J.. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 7: 551, 1958.
 8. FONSECA B.A.L., KHOSHNOOD K., SHOPE R.E. & MANSON P.W.. Flavivirus Type- Specific Antigens Produced from Fusions of a Portion of the E Protein Gene with the Escherichia coli TrpE Gene. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 500-508, 1991.
 9. GUBLER, D.J.. Dengue/Dengue Hemorrhagic fever in the Americas: Prospects for the year 2000. pg-19-27. In: *Dengue: A Worldwide Problem, a Common Strategy*. Ed. by S.B. Halstead & Gomez-Dantes, 1992.
 10. HALL, R.A.; KAY, H.B.; BURGESS, G.W.; CLANCY, P. & FINNING, I.D.. Epitope analysis of the envelope and non-structural glycoproteins of Murray Valley encephalitis virus. *J. Gen. Virol.*, 71:2923-2930, 1990.
 11. HALSTEAD, S.B.. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology- *Science*, 239: 476- 481, 1988
 12. HASEGAWA, W.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S. & KOBAYASHI, Y.. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology*, 191: 158-165, 1992.
 13. HEINZ, F.X.. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Virus Res.*, 31: 103-168, 1986.
 14. HENCHAL, E.A.; McCOWN, J.M.; BURKE, D.S.; SEGUIN, M.C. & BRANDT, W.E.. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 162-167, 1985.
 15. KUNO, G.; GÓMEZ, I. & GUBLER, D.J.. Detecting artificial anti-dengue IgM Immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Trop. Med. Hyg.*, 36: 153-159, 1987.
 16. LINDO, J.F.; CONWAY, D.J.; ATKINS, N.S.; BIANCO, A.E.; ROBINSON, R.D. & BUNDY, D.A.P.. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Trongyloides stercoralis* infection. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 51: 175-179, 1994.
 17. MANDL, C.W.; HEINZ, F.X.; STÖCKL, E. & KUNZ, C.. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other Flaviviruses. *Virology*, 173: 291-301, 1989.
 18. MASON, P.W.; DALRYMPLE, J.M.; GENTRY, M.K.; McCOWN, J.M.; HOKE, C.H.; BURKE, D.S.; FOURNIER, M.J. & MASON, T.L.. Molecular Characterization of the Japanese Encephalitis Virus Structural Glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 70: 2037- 2049, 1989.
 19. MASON, P.W.; ZUGEL, M.U.; SEMPRONI, A.R.; FOURNIER, M.J. & MASON, T.L.. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in Escherichia coli. *J. Gen. Virol.*, 71: 2107-2114, 1990.
 20. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washington, D.C.: PAHO, 1994.
 21. RICE, C.M.; STRAUSS, E.G. & STRAUSS, J.H.. Structure of the flavivirus genome. In: S. Schlesinger & M.J. Schlesinger. *Togaviridae and Flaviviridae*, New York: Plenum, 1986, 279-326.
 22. ROEHRIG, J.T.; JOHNSON, A.J.; HUNT, A.R.; BOLIN, R.A. & CHU, M.C.. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology*, 177: 668-675, 1990.
 23. ROEHRIG, J.T.; MATHEWS, J.H. & TRENT, D.W.. Identification of epitopes on the E glycoprotein of St. Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Virology*, 128: 118, 1983.
 24. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 25. SELB, B. & WEBER, B.. A study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and Western blot. *J. Virol. Methods*, 47: 15-26, 1994.
 26. SMITH, G.W. & WHIGHT, P.J.. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and Aedes albopictus cells. *J. Gen. Virol.*, 66: 559-571, 1985.
 27. TOWBIN, H.; STAHELIN, T. & GORDON, J.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354, 1979.
 28. VOLLER, A. & BIDWELL, D.. Enzyme-linked immunosorbent assay. In Rose, N.R./Fridman, H & Fahey, J.H. eds. *Manual of Clinical Laboratory*

- Immunology*. Washington, DC American Society for Microbiology. 99-109, 1986
29. WESTAWAY, E.G. Flavivirus replication strategy. *Adv. Virus Res.*, 33: 45-90 1987.
30. WESTAWAY, E.G. Replication of Flavivirus In: *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press, 1980, 531- 581.

Recebido para publicação em 10/06/1999

Impresso em off set



Rua Clark, 136 - Moóca
03167-070 - São Paulo - SP
Fones: (0XX) 0692-7344
6692-2226 / 6692-8749

com tintas fornecidas pelo editor