

ESTUDO SOBRE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E SINTOMAS DO DENGUE, DURANTE EPIDEMIA OCORRIDA NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, SP, BRASIL

Luiz Tadeu Moraes FIGUEIREDO (1), Miyoko Abe OWA (1),
Rita Helena CARLUCCI (2) & Luzia de OLIVEIRA (1)

RESUMO

Uma epidemia de dengue tipo 1 se iniciou em Novembro de 1990 na Região de Ribeirão Preto, Norte do Estado de São Paulo. Foram confirmados por exames laboratoriais cerca de 3.500 casos até fevereiro de 1991. A Unidade de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, estudou soros de 502 pessoas suspeitas de apresentarem dengue. Fez-se o diagnóstico sorológico através do método da inibição da hemaglutinação (HAI) para dengue tipo 1 em 19% dos analisados. Passou-se a utilizar um teste imuno-enzimático para dengue em culturas celulares infectadas (EIA-ICC), que permite identificação simultânea de IgG e IgM. O EIA-ICC embora menos sensível quando comparado ao HAI (89%), mostrou-se mais eficiente, porque dispensou a obtenção de segundas amostras séricas para o diagnóstico; trata-se de técnica simples, podendo ser efetuada em apenas 5 horas. O vírus dengue tipo 1 foi isolado do sangue de 21 pacientes, por inoculação em células de mosquitos C6/36. Fez-se a identificação dos vírus isolados por método de imunofluorescência indireta, utilizando anti-soro contra todos os flavivirus e anticorpos monoclonais tipo-específicos de dengue. Os sintomas mais freqüentemente observados em 71 indivíduos com diagnóstico de dengue confirmado foram febre (90% dos casos), mialgias (57%) e artralgias (41%).

UNITERMOS: Dengue; Epidemia em Ribeirão Preto; Diagnóstico laboratorial, Sintomatologia.

INTRODUÇÃO

Os 4 tipos de vírus do dengue denominados pelos números 1, 2, 3 e 4, pertencem à família Flaviviridae². Estes vírus são causa da mais importante arbovirose que afeta o homem, devido às epidemias explosivas de doença febril, descritas em várias regiões da terra, com alta morbidade, incapacitando temporariamente milhões de pessoas¹². Também são causa de uma doença grave, muitas vezes fatal, denominada dengue hemorrágico/síndrome de choque do dengue (DHF/DSS)¹³.

Grandes epidemias de dengue vêm ocorrendo no Brasil nos últimos 10 anos. Após 60 anos de aparente ausência do país, em 1981 ocorre um surto de dengue em Boa Vista, Roraima, causando 7.000 casos. Nesta ocasião, foram isolados os tipos

1 e 4 a partir de pacientes e do *Aedes aegypti*²⁰. No Rio de Janeiro e cidades satélites, em março de 1986, inicia-se uma grande epidemia de dengue tipo 1²². Cerca de 80.000 casos foram notificados até 1987. A maioria dos indivíduos infectados, provavelmente mais de 3 milhões, apresentou doença febril com pequena gravidade¹⁰. Esta epidemia espalhou-se posteriormente pelo nordeste brasileiro, atingindo Alagoas em junho e Ceará em setembro de 1986. Também em Mato Grosso do Sul ocorrem casos desde 1987¹⁶. A partir de abril de 1990 começam a aparecer casos de dengue tipo 2 no Rio de Janeiro e Niterói¹⁸. Mais de 17.000 casos de dengue foram notificados no Estado do Rio de Janeiro em 1990, sendo aproximadamente 2% como o DHF/DSS⁴.

(1) Unidade de Pesquisa em Virologia do Departamento de Clínica Médica (Disciplina de Moléstias Infecciosas e Tropicais), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

(2) Laboratório de Virologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Endereço para Correspondência - Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, Unidade de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Campus da USP, CEP 14049, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Finalmente, numa extensão da epidemia, o dengue é introduzido no Estado de São Paulo. Após um pequeno surto ocorrido no oeste do estado em 1987²⁶, rapidamente controlado, em novembro de 1990, surgem os primeiros casos autóctones de dengue tipo 1 na cidade de Ribeirão Preto⁵.

Ribeirão Preto situa-se a 21° e 11' de latitude sul e 47° e 49' de longitude oeste, no norte do Estado de São Paulo (Figura 1). A cidade tem 452.746 habitantes (1990) e é sede regional de governo para 22 municípios, com população total de 885.182 habitantes (1990). Trata-se de região com uma das maiores rendas per capita nacionais e cuja principal fonte de recursos é proveniente da agroindústria canavieira²⁴.

Foram confirmados por exames de laboratório na Região de Ribeirão Preto, até o final de fevereiro, 3.234 casos de dengue na forma "benigna" (Figura 2). A epidemia de dengue espalhou-se por vários municípios, tais como Brodósqui,

Jardinópolis, Jaboticabal, Pontal, Pitangueiras, Serana e Sertãozinho (Figura 1) com 215 casos confirmados por laboratório até fevereiro. Também vêm ocorrendo casos em outras regiões do estado⁵.

A Unidade de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (UPV), vem participando no controle da epidemia de dengue, fazendo o diagnóstico laboratorial dos casos atendidos no Hospital das Clínicas desta Faculdade e órgãos de saúde pública. Pretende-se com este trabalho informar sobre os métodos diagnósticos utilizados na UPV, discutindo resultados obtidos e sintomas apresentados por um grupo de pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Quinhentas e duas pessoas de ambos os sexos, com idades variando entre 1 e 76 anos, foram estudadas pela UPV quanto à infecção por dengue, entre os meses de dezembro de 1990 e abril de 1991.

Diagnóstico sorológico

Inibição da hemaglutinação (HAI)

Os antígenos de dengue tipo 1 utilizados no HAI foram preparados pelo método da sacarose-acetona, a partir de cérebro de camundongos infectados com a cepa Mochizuki. Tratou-se os soros humanos em teste com caolim visando retirar inibidores inespecíficos da hemaglutinação e as hemaglutininas inespecíficas foram removidas



◀ Figura 1. Municípios que compõem a Região de Ribeirão Preto (ERSA-50). Localização da Região no Estado e no Brasil. Estão assinalados com triângulo os municípios com mais de 50 casos de dengue notificados até fevereiro de 1991.

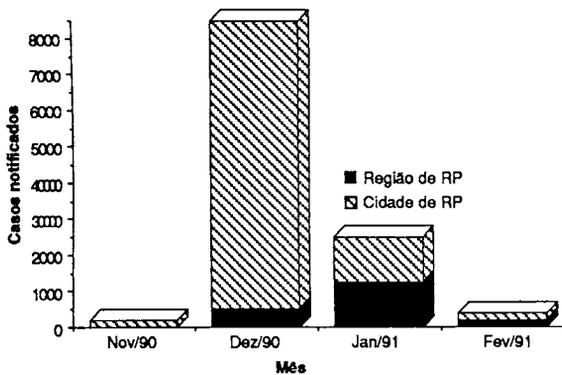


Figura 2. Casos de dengue notificados na Cidade e na Região de Ribeirão Preto entre novembro de 1990 e fevereiro de 1991 (dados do ERSA-50).

por absorção em hemácias de ganso. O teste HAI foi efetuado em microplacas de 96 orifícios e a hemaglutinação, em pH 6.2, foi promovida com 4 a 8 unidades hemaglutinantes²⁵. Parte das amostras séricas testadas eram pareadas (fase de doença e após 15 a 30 dias). Os resultados foram considerados positivos quando ocorria elevação maior do que 4 vezes nos títulos séricos da segunda amostra comparados aos da primeira. Também títulos muito elevados (≥ 2.560), obtidos em qualquer amostra, foram considerados positivos e relacionados a infecções secundárias por flavivirus¹⁹.

Foram estudados por HAI 469 indivíduos ou 589 soros incluindo neste grupo mais de uma centena de segundas amostras (Figura 3).

Ensaio imunoenzimático em culturas de células infectadas

A partir de fevereiro de 1991 passamos a utilizar um teste imunoenzimático em culturas celulares

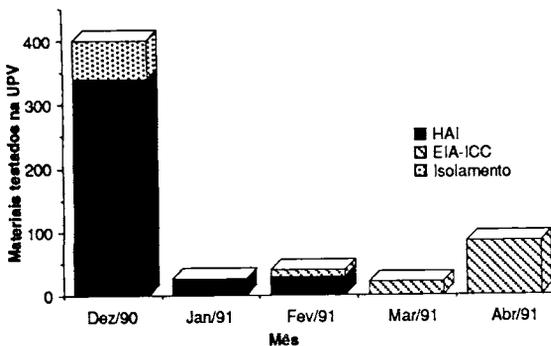


Figura 3. Número de materiais testados para dengue e tipos de exames efetuados na Unidade de Pesquisa em Virologia, entre os meses de dezembro de 1990 e abril de 1991.

res infectadas, para diagnóstico sorológico do dengue: o EIA-ICC ("Enzyme Immuno-assay on Infected Cultured Cells")^{7,8}. Para tanto, cultivou-se em frascos estéreis de poliestireno (DESCARPLAST), células do mosquito *Aedes albopictus*, da linhagem C6/36, em meio de cultivo Leibowitz L15, contendo 6% de soro fetal bovino, 10% de solução de fosfato de triptose, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram mantidas a 28°C em atmosfera úmida até formarem monocamadas confluentes. Infectou-se frascos com o vírus do dengue tipo 1 estirpe RibH 830 (isolada de um paciente de Ribeirão Preto e identificada com anticorpos monoclonais¹⁴), outros frascos foram mantidos sem infecção. Incubou-se 5 dias a 28°C e transferiu-se as células para microplacas de poliestireno estéreis contendo 96 orifícios de fundo chato (CORNING-USA). As células foram colocadas numa quantidade de 10^6 por 100 µl por orifício, respeitando-se a seguinte ordem: células infectadas e não infectadas em colunas de orifícios alternadas. Após incubação "overnight" a 28°C, as placas foram fixadas em formalina tamponada pH 7 (37-40% de formaldeído-100ml, fosfato de sódio dibásico anidro-6,5g, fosfato de sódio monobásico-4g e água destilada-900 ml), acrescentando-se 50 µl por orifício, e incubadas "overnight" a 4°C. Posteriormente, lavou-se 2 vezes os orifícios em PBS e sequeou-se. As placas, prontas para o teste, foram armazenadas a 70°C ou utilizadas imediatamente^{7,8}.

O EIA-ICC propriamente dito foi efetuado acrescentando-se 200 µl por orifício de uma solução bloqueadora contendo gelatina a 5% em PBS e incubando-se as placas a 37°C por 2 horas. Lavou-se os orifícios 3 vezes com Tween-20 a 0,05% em PBS. Acrescentou-se a orifícios contendo as células previamente infectadas com dengue tipo 1 (teste) e aos contendo células não infectadas (controle), 100 µl de cada soro humano analisado, nas diluições 1/500, 1/2000, 1/8000 e 1/32000 em albumina bovina 0,5% em PBS. Incubou-se 1 hora a 37°C, lavou-se os orifícios 3 vezes com PBS-Tween e, dependendo do interesse (detecção de IgG ou IgM), acrescentou-se 100 µl a orifícios teste e controle de imunoglobulina caprina anti-IgG ou IgM humano - conjugada à peroxidase (SIGMA-USA), na diluição 1/2000. Incubou-se as placas por 1 hora a 37°C, lavou-se os orifícios 5 vezes com PBS-Tween e acrescentou-se o substrato ABTS (KIRKGAARD & PERRY-USA). A leitura, visual, foi feita após 10 minutos de incubação a 37°C, comparando-se a cor verde em orifícios

cios teste com ausência de cor nos controles (Figura 4)^{7,8}.

Foram testados por EIA-ICC para dengue tipo

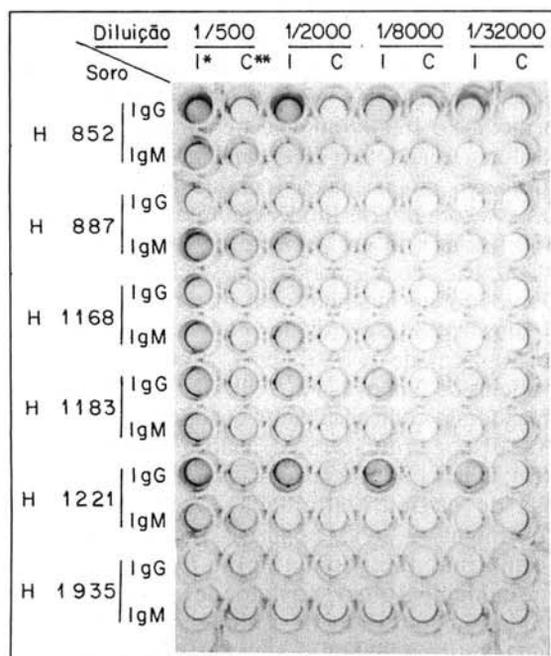


Figura 4. EIA-ICC em microplaca para detecção simultânea de IgG e IgM contra dengue tipo 1. Teste de 6 soros humanos. *I - Coluna de orifícios contendo células infectadas com dengue tipo 1. **C - Coluna de orifícios controle, contendo células não infectadas. O soro H852 apresentou título de IgG para dengue tipo 1 de 32000 e IgM de 500; o soro H887 mostrou IgG < 500 (negativo) e IgM de 2000; o soro H1168, IgG de 2000 e IgM de 8000; o soro H1183, IgG de 8000 e IgM de 2000; o soro H1221, IgG de 32000 e IgM de 500; o soro H1935, IgG e IgM < 500.

1, 107 soros, até abril de 1991 (Figura 3). Com base em resultados obtidos previamente por HAI, selecionou-se soros de 74 pacientes de ambos os sexos, idades entre 1 e 73 anos, colhidos em diferentes tempos de doença, visando analisar seus resultados por EIA-ICC e compará-los com aqueles do teste HAI. Foram utilizados na análise os testes estatísticos X² (p<0,05) e coeficiente de correlação de Pearson.

Diagnóstico virológico

Isolamento de vírus

Promoveu-se tentativas de isolamento de vírus nas amostras do sangue total de 62 pacientes em fase inicial da doença (Figura 3). As alíquotas fo-

ram mantidas a -70°C, visando conservar os vírus viáveis. Preferiu-se sangue total ao soro devido à presença dos vírus do dengue em leucócitos. Para o isolamento viral utilizou-se células C6/36 em 2 ml do meio de cultivo previamente referido, contidas em tubos de vidro. Os tubos apresentando monocamadas celulares confluentes foram inoculados com aproximadamente 100 µl do sangue hemolisado, diluído 1/10 em PBS²⁷. Manteve-se as células inoculadas 7 a 10 dias, a 28°C, observando-se diariamente os tubos ao microscópio, para detecção do efeito citopático (ECP) causado por vírus. Observou-se em casos de isolamento do vírus do dengue tipo 1, ECP inicial caracterizado por citólise de pequenas células individuais, que evoluía com o aparecimento de largas massas celulares sinciciais de aumento gradual e numa fase mais avançada, destruição da colônia celular (Figura 5)^{9,22}.

Identificação dos isolamentos por imunofluorescência

Todas as colônias celulares inoculadas para isolamento de vírus foram testadas quanto à presença de flavivírus e vírus do dengue, por imunofluorescência indireta. Transferia-se as células dos tubos para "spots" em lâminas de microscópio, o material era seco e fixado por 10 minutos imerso em acetona gelada. Na primeira etapa do processo de identificação, acrescentava-se aos "spots" fluido ascítico imune (FAIM), "pool" para flavivírus, na diluição 1/10 em PBS. Incubava-se a 37°C por 30 minutos e finalmente se acrescentava imunoglobulina caprina anti-IgG de camundongo conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (MICROBIOLOGICA) na diluição 1/35 em PBS, contendo azul de Evans a 1/5000. Após identificação de flavivírus positiva pelo FAIM, promovia-se um segundo teste, utilizando anticorpos monoclonais específicos, contra os 4 tipos de dengue ("Dengue Branch, Center for Infectious Diseases, San Juan/Puerto Rico") na diluição 1/10 em PBS. Fazia-se a leitura do teste em microscópio de fluorescência Dialux 20 (Leitz-Alemanha) equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão (Figura 6)^{14,27}

Preparo de fluido ascítico imune (FAIM)

Os FAIM utilizados no teste de imunofluorescência foram obtidos em camundongos adultos (*Mus-musculus* - variedade albino suíço), inoculados pela via intraperitoneal, semanalmente, 4 ve-

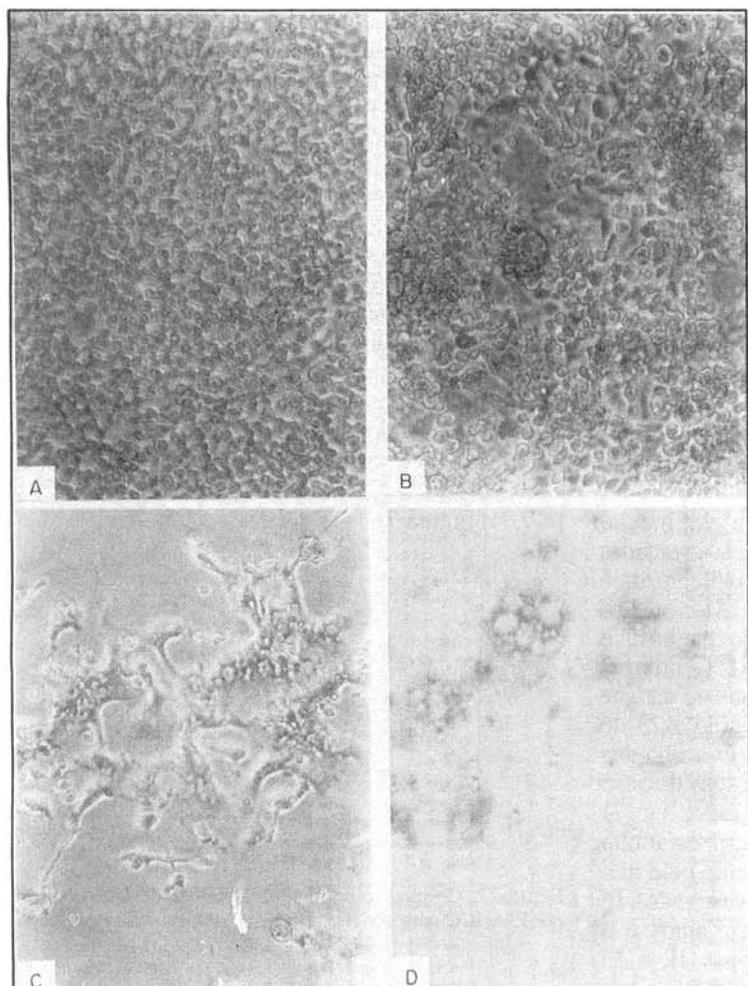


Figura 5. Efeito citopático observado em culturas de células de *Aedes albopictus* C6/36, infectadas com vírus do dengue tipo 1 isolado em Ribeirão Preto. A) Aspecto normal de uma monocamada celular. B) Fenômenos iniciais de desorganização em colônia de células infectadas, com presença de sincícios. C) Grande massa celular sincicial. D) Estágio avançado da infecção, com extensa destruição celular.

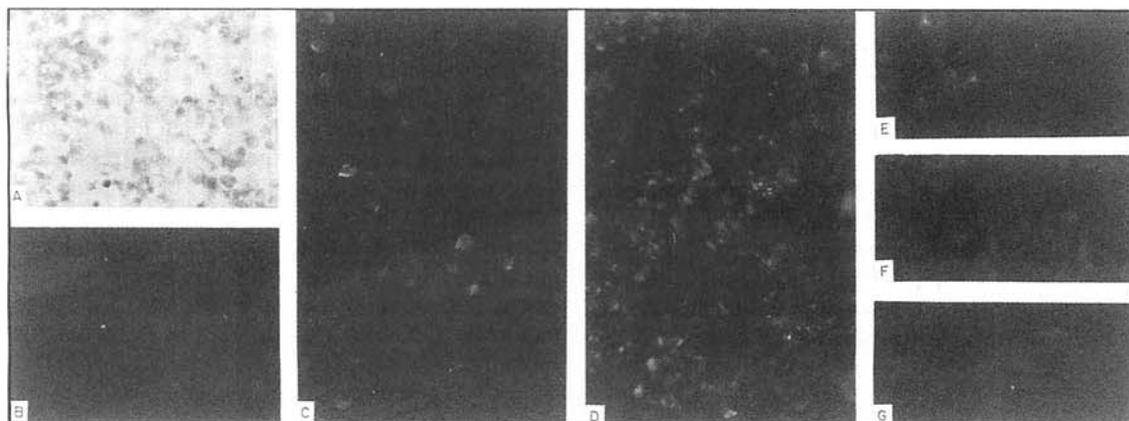


Figura 6. Identificação viral do dengue tipo 1 por teste de imunofluorescência indireta, após o isolamento em células de *Aedes albopictus* C6/36 A) Aspecto das células na lâmina. B) Células não infectadas contra FAIM "pool" de flavivirus (controle negativo). Teste de células infectadas: C) contra FAIM "pool" de flavivirus. D) Contra anticorpo monoclonal de dengue tipo 1. E) Contra monoclonal de dengue tipo 2. F) Contra monoclonal de dengue tipo 3. G) Contra monoclonal de dengue tipo 4.

zes, com macerado do cérebro de camundongos recém-nascidos infectados com flavivirus. Após a última imunização inoculava-se pela via intraperitoneal o Sarcoma 180/TG e os animais desenvolviam ascite volumosa, rica em anticorpos específicos¹. Um "pool" para flavivirus foi preparado, misturando volumes iguais dos fluídos ascíticos de animais imunizados com dengue tipo 1, febre amarela, Rocio, Ilhéus e vírus da Encefalite de St. Louis.

Estudo sobre sintomas de dengue e infecções secundárias

Dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP obteve-se informações quanto aos sintomas apresentados, tempo de doença e vacinação anti-amarela. Essas informações foram estudadas em um grupo de 71 pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado de dengue (HAI e/ou isolamento viral) e em 21 indivíduos cujo diagnóstico não se confirmou pelo teste HAI (amostras pareadas negativas). O grupo dos casos de dengue continha 48 indivíduos do sexo feminino e 23 do masculino, idades entre 7 e 70 anos. O grupo dos casos com outra infecção tinha 11 pessoas do sexo feminino e 10 do masculino, idades entre 1 e 71 anos. Os sintomas referidos nos 2 grupos foram comparados e analisados estatisticamente pelo método X² ($p < 0,05$). Também foram investigados 15 pacientes de ambos os sexos (12 femininos e 3 masculinos), com idades variando entre 19 e 53 anos, que apresentaram resultados sugestivos de infecção secundária por flavivirus no teste HAI para dengue tipo 1.

RESULTADOS

HAI

Soros em número de 206 (35%), pertencentes a 120 pacientes, mostraram-se reagentes por HAI para dengue tipo 1, com títulos variando entre 10 e 2.560. Em 91 indivíduos (19% dos casos estudados por HAI), foi possível a confirmação do diagnóstico de dengue pelos critérios já citados. Em 7 casos o diagnóstico foi confirmado por HAI e isolamento viral.

EIA-ICC

Em 60 soros detectou-se anticorpos para dengue tipo 1 por EIA-ICC (56% dos testados).

Os resultados observados por EIA-ICC em 74 soros foram comparados aos obtidos com o teste HAI. Destes materiais, 62 foram positivos por HAI e 57 por EIA-ICC (IgG e/ou IgM). Dos 5 soros reagentes apenas por HAI, 4 foram obtidos menos de 4 dias após o início dos sintomas e um após 60 dias. Dentre soros que mostraram resultado positivo por HAI e/ou EIA-ICC, anticorpos do tipo IgM foram encontrados em 43 de 64 soros (67%). IgM para dengue foi detectado entre 4 e 46 dias após o início dos sintomas da doença e IgG entre 3 e 46 dias. Observou-se uma associação significativa entre os resultados obtidos pelas 2 técnicas ($X^2 = 28,88$, $p < 0,002$). A sensibilidade do EIA-ICC foi de 89% (IgG e/ou IgM). Também foi detectada correlação entre os títulos séricos observados para IgG por EIA-ICC e HAI, $r = +0,734$ ($t = 9,29$, $p < 0,01$; Figura 7).

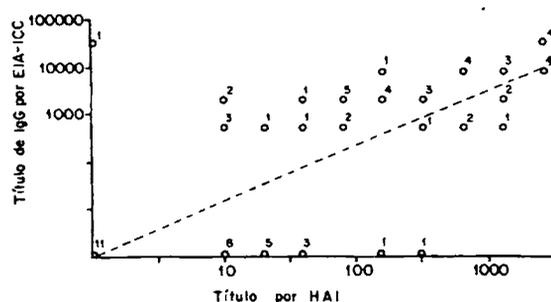


Figura 7. Correlação entre títulos séricos de IgG obtidos por EIA-ICC para dengue tipo 1 e os observados por HAI.

Isolamento viral

Conseguiu-se resultado positivo em 34% das tentativas de isolamento viral. Vinte e uma amostras de dengue, todas do tipo 1, foram identificadas por imunofluorescência. Apenas 14 dos pacientes, dos quais se isolou dengue tipo 1, informaram sobre tempo de doença no momento da colheita amostral. Todos referiram este tempo igual ou menor que 5 dias (4 dias em 4 casos; 1 dia em 3 casos; 5 dias em 2 casos; 2 dias em 2 casos e menos de 1 dia em 1 caso). Não se isolou outros flavivirus.

Sintomas de dengue

Os sintomas apresentados por 2 grupos de indivíduos, grupo casos de dengue e grupo casos com outra infecção, estão citados na Tabela 1. As

diferenças de positividade observadas para os sintomas referidos nos 2 grupos não tiveram resultado significativo, com exceção da cefaléia que foi mais elevada no grupo de casos com outra infecção.

Tabela 1

Sintomas apresentados por 71 pacientes confirmados laboratorialmente como casos de dengue, durante a epidemia de Ribeirão Preto e sintomas referidos por 21 pacientes com infecções agudas ocorridas na mesma época, comprovadas laboratorialmente como não sendo dengue.

Sintoma	Casos de dengue		Casos com outra infecção	
	Nº	Positividade (%)	Nº	Positividade (%)
febre	64	90	19	90
mialgias	41	57	9	43
artralgias	29	41	8	39
dor retro-ocular	21	34	3	14
exantema	13	18	7	33
cefaléia*	11	15	11	52
anorexia	8	11	2	10
adinamia	8	11	2	10
vômitos	3	4	3	14
adenopatia	3	4	2	10
dist. hemorrágicos	0	0	0	0

*diferença significativa $X^2 = 12,118$ ($p \leq 0,01$)

Infecção secundária por flavivirus

Quinze pacientes apresentaram títulos recíprocos HAI de 2.560. Dez casos apresentaram estes níveis apenas na 2ª amostra, com elevação acima de 8 vezes nos títulos, o que caracteriza uma viragem sorológica. Em 2 pacientes do sexo feminino, com 43 e 44 anos, observou-se títulos HAI de 2.560 em amostra sérica colhida 2 e 4 dias após o início dos sintomas. Ambas negavam vacinação anti-amarela progressiva.

DISCUSSÃO

A epidemia de dengue tipo 1 na Região de Ribeirão Preto acometeu população susceptível em sua imensa maioria. Um inquérito sorológico efetuado na Região, em 1983 e 1984, detectou anticorpos HAI para flavivirus em 7,2% dos indivíduos estudados⁶. Atribuiu-se boa parte destes casos a uma resposta imune à vacinação anti-amarela

ca progressiva. Cinco casos apresentaram anticorpos para dengue tipo 1, provavelmente uma reação cruzada em infectados com outros flavivirus, o que é comum quando se utiliza o teste HAI.

A UPV mobilizada pela epidemia de dengue, conseguiu estabelecer rapidamente uma metodologia laboratorial diagnóstica, utilizando técnicas tradicionais com pequenas modificações e outras modernas, as quais são divulgadas neste trabalho.

O método sorológico HAI para o diagnóstico de dengue foi inicialmente utilizado devido a sua alta sensibilidade e relativa facilidade de execução²⁵. Contudo, a confirmação diagnóstica por HAI exige amostras séricas pareadas ou procedimentos laboriosos visando separar anticorpos IgM nos soros em teste. Neste estudo, segundas amostras mostraram-se de difícil obtenção, conseguidas em apenas 20% dos casos.

O ensaio imunoenzimático (EIA-ICC), discriminando anticorpos IgG e IgM para dengue tipo 1, mostrou-se de grande utilidade neste trabalho. Trata-se de método sensível e mais simples que outras técnicas imunoenzimáticas, como a MAC-ELISA¹⁷, também utilizada no diagnóstico do dengue. O EIA-ICC dispensa longas sensibilizações em fase sólida e laboriosos tratamentos de soros e antígenos^{7,8}. Após preparo e armazenamento das microplacas a -20°C, EIA-ICC pode ser efetuado em qualquer laboratório, mesmo naqueles com poucos recursos técnicos, permitindo em apenas 5 horas, por leitura visual dos resultados, a análise de um grande número de soros⁷. A detecção dos anticorpos IgM para dengue tipo 1, por EIA-ICC, teria dispensado a segunda amostra sérica na confirmação diagnóstica de 67% dos casos estudados, se utilizada desde o início da epidemia. A detecção de IgG simultânea à IgM permite estudar a evolução dos 2 tipos de anticorpos e seus níveis, nas infecções por dengue. O tempo pós-início dos sintomas, nos casos estudados por EIA-ICC, mostrou IgG detectável entre 3 e 36 dias e IgM entre 4 e 36 dias. Estes resultados estão de acordo com estudo anterior⁵, em que anticorpos do tipo IgM e IgG para dengue tipo 1, foram encontrados por EIA-ICC 4 dias após o início dos sintomas, as IgM passaram a não ser detectáveis após 60 dias e as IgG se mantiveram presentes por pelo menos 300 dias⁸. Sabe-se que os títulos de IgG para flavivirus se mantêm elevados e estáveis por muitos anos⁶. Assim, inquéritos sorológicos populacionais de

dengue (Flavivirus) podem ser efetuados utilizando IgG detectada por EIA-ICC.

A presença de reações inespecíficas no EIA-ICC, com soros humanos à diluições de até 1/200, orientou a realização dos testes com diluição inicial 1/500. Acredita-se que as altas diluições séricas, que reduzem substancialmente o "background" e melhoram a qualidade do teste, tenham reduzido a sua sensibilidade a 89% quando comparado ao HAI. Este valor é inferior ao encontrado em trabalho anterior no qual EIA-ICC foi mais sensível que o teste HAI⁸. Observa-se na Figura 4 uma discreta cor inespecífica na primeira coluna de orifícios controle, que contém soros à 1/500, sem contudo impossibilitar a leitura do teste (Figura 4). Os soros reagentes por HAI e negativos por EIA-ICC foram obtidos na sua maioria em fase aguda da doença (4 soros foram obtidos com 4 dias ou menos do início dos sintomas) e provavelmente apresentavam níveis muito baixos de anticorpos. Uma correlação entre títulos de IgG por EIA-ICC e HAI, $r=+0,734$, foi observada (Figura 7). Sabe-se que o tratamento dos soros pelo caolin previamente ao teste HAI tem por efeito indesejável a remoção de IgM²⁵. Portanto, detectou-se basicamente IgG, o que explica a correlação. Encontrou-se 4 soros com títulos de IgG por EIA-ICC para dengue tipo 1 bastante elevados, de 32.000.

A positividade de 34% obtida nas tentativas de isolamento de vírus do dengue em células de mosquito C6/36, pode ser considerada boa quando comparada a resultados de outros pesquisadores utilizando a mesma metodologia, 5 a 40%³. O tempo de doença em que se obteve amostras, das quais se isolou vírus, foi bastante precoce: 5 dias ou menos nos 14 casos em que havia este dado. Outros autores¹⁷ observaram, com a mesma técnica, a seguinte positividade no isolamento para vírus do dengue tipo 1: 68% no 4º dia de doença, 39% no 5º dia e 13% no 6º. Sabe-se que o período virêmico detectável na maioria dos casos de dengue tipo 1 não excede 5 dias, coincidindo a queda no número de partículas virais infectantes com a elevação nos teores de anticorpos neutralizantes séricos¹¹.

O ECP produzido pelo vírus do dengue tipo 1, caracterizado em células de mosquito, pelo aparecimento de grandes sincícios e destruição celular, foi freqüentemente observado (Figura 5). Este efeito tem sido notado por alguns autores com vírus do dengue e outros flavivirus^{9,22}. Contudo, a presença de alteração citopática nestes casos não deve ser

conclusiva do diagnóstico de dengue, por não ser observada em todas as inoculações e também por ocorrer com outros flavivirus e arbovirus de outras famílias⁹.

O processo de identificação viral por imunofluorescência, em 2 etapas, visou não perder a oportunidade de isolar outros flavivirus ou outros tipos de dengue. Relatos sobre circulação simultânea de mais de um vírus em epidemias de febre amarela e dengue são ocasionalmente referidos^{20,21}. O uso de um "pool" de fluídos ascíticos imunes no teste de imunofluorescência, permitia identificar outros flavivirus eventualmente circulantes, contudo não se observou tal fato nesta epidemia. Os testes de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais mostraram-se específicos e de fácil leitura¹⁴. Observou-se apenas uma discreta fluorescência em células infectadas com o vírus do dengue tipo 1, no teste contra anticorpo monoclonal de dengue tipo 3 (Figura 6).

Este estudo, com 71 indivíduos portadores de dengue e 21 casos de febre por outra etiologia, mostrou sintomas similares para os 2 grupos (Tabela 1). Foram mais freqüentes a febre (90% dos casos), mialgias (57%) e artralgias (41%). Estes sintomas são comuns a diferentes infecções. A dor retro-ocular foi mais freqüente nos pacientes com dengue, embora sem significado estatístico. A cefaléia mostrou-se significativamente menos freqüente nos casos de dengue. O exantema foi referido em menos de 1/5 dos pacientes com dengue. Não foram observados fenômenos hemorrágicos nos casos estudados. A febre do dengue, dengue clássico ou dengue "benigno", que foi a forma da doença ocorrida em Ribeirão Preto, costuma manifestar-se de forma variável quanto ao tipo e intensidade dos sintomas, nas diferentes epidemias²³. Chama atenção a baixa freqüência de cefaléia, 15%, quando comparada aos mais de 90% observados em estudo semelhante, efetuado durante a epidemia de dengue tipo 1 no Rio de Janeiro¹⁵. Neste estudo, os autores encontraram fenômenos hemorrágicos discretos em poucos casos.

Duas pacientes do sexo feminino exibiram títulos de 2.560 no HAI para dengue tipo 1, em amostras séricas colhidas 2 e 4 dias após o início dos sintomas. Tais títulos são compatíveis com resposta imune anamnésica à infecção secundária por flavivirus¹⁹. Ambas as pacientes tinham mais de 40 anos e, embora negassem vacinação anti-amarela, poderiam ter se infectado por flavivirus

circulantes no meio silvestre da região, tais como o Ilhéus e o vírus da Encefalite de St. Louis, em época que habitaram ou trabalharam na zona rural⁶.

A UPV pretende continuar os trabalhos com dengue na Região de Ribeirão Preto, visando o diagnóstico laboratorial de casos e a vigilância quanto à introdução de outros tipos na região. Pretende-se também fazer um inquérito sorológico populacional para diagnóstico da extensão desta epidemia e estudar o risco de aparecerem casos de DHF/DSS se ocorrerem surtos por outros tipos de dengue.

SUMMARY

Laboratory Diagnosis and Symptoms of Dengue Studied During an Outbreak in the Ribeirão Preto Region, SP, Brazil

A dengue type 1 outbreak started in the Ribeirão Preto Region, North of São Paulo State, Brazil, in November of 1990. About 3500 dengue cases were confirmed by blood tests until February of 1991. The Virus Research Unit of The Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - São Paulo State University, studied 502 dengue suspect cases. The serologic diagnosis of dengue type 1 was confirmed by haemagglutination inhibition test (HAI) in 19% of the cases. Diagnosis was done later by using an enzyme immuno assay on infected cultured cells (EIA-ICC) which discriminated IgG and IgM dengue, antibodies. EIA-ICC was less sensitive (89%) but more effective than HAI. EIA-ICC is a simple technique. It dispenses a second serum sample for diagnosis and it can be completed in about 5 hours. Dengue virus was isolated from the blood of 21 patients by inoculation in culture of mosquito C6/36 cells. The isolated virus were identified by indirect immunofluorescent test, by using an antisera pool to the flavivirus family and dengue type specific monoclonal antibodies. The dengue most frequent symptoms in 71 patients were observed: fever (90%), myalgias (57%) and arthralgias (41%).

AGRADECIMENTOS

A Daniel Capuano pelo auxílio na colheita dos soros e a José Tavares Carneiro Neto pelo auxílio na análise dos dados. Aos membros da Equipe de Vigilância do Dengue, ERSA 50, Ribeirão Preto,

Ricardo José Soares Pontes, Gutemberg de Melo Rocha, Amauri Leles Dal Fabro, Vilma Delphino de Oliveira Garotti, Ana Alice M.C. de Castro e Silva e Roseli Claudino Santiago, pelo apoio dispensado. Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à FAPESP (Processo 88/4076-8) que deram suporte financeiro a este trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDT, W.E.; BUESCHER, E.L. & HETRICK, F.M. - Production and characterization of arbovirus antibody in mouse ascitic fluid. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 16: 339-347, 1967.
2. BROWN, F. - The classification and nomenclature of viruses: summary of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology*, 25: 141-143, 1986.
3. CARDOSA, J. - Dengue virus isolation by antibody-dependent enhancement of infectivity macrophages. *Lancet*, 1: 193-194, 1987.
4. CUNHA, R.V. & NETTO, G.F. - Aspectos clínico-epidemiológicos do dengue hemorrágico no Município do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 24 (Supl. 2): 123, 1991.
5. ERSA 50/LAL/SUCEN/CPVE-DMS-FMRP. Dengue - aspectos clínicos. Boletim Epidemiológico Nº 1. Ribeirão Preto, 1991.
6. FIGUEIREDO, L.T.M. - Estudo sobre infecções por arbovírus na Região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Ribeirão Preto, 1985 (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP).
7. FIGUEIREDO, L.T.M. & SHOPE, R. - An enzyme immuno assay for dengue antibody using infected cultured cells as antigen. *J. virol. Meth.*, 17: 191-198, 1987.
8. FIGUEIREDO, L.T.M.; SIMÕES, M.C. & CAVALCANTE, S.M.B. - Study on an enzyme immuno assay for dengue IgG and IgM antibodies detection using infected mosquito cells as antigen. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 83: 702-707, 1989.
9. FIGUEIREDO, L.T.M. - Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae e Rhabdoviridae. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 23: 13-18, 1990.
10. FIGUEIREDO, L.T.M.; CAVALCANTE, S.M.B. & SIMOES, M.C. - Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987. *Bull. Pan. Amer. Hlth. Org.*, 24: 217-225, 1990.
11. GUBLER, D.J.; SUHARYONO, W.; TAN, R.; ABIDIN, M. & SIE, A. - Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 59: 623-630, 1981.

12. GUBLER, D.J. - Current research on dengue. In: **Current Topics in Vector Research**, Vol. 3. New York, Springer - Verlag, 1987. p. 37-56.
13. HALSTEAD, S.B. - Dengue haemorrhagic fever - a public health problem and a field for research. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **58**: 1-21, 1980.
14. HENCHAL, E.A.; McCOWN, J.M.; SEGUIN, M.C.; GENTRY, M.K. & BRANDT, W.E. - Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **32**: 164-169, 1983.
15. MARZOCHI, K.B.F.; CARNEIRO, M.B.; SCHATZMAYR, R.M.; NOGUEIRA, R.M.R.; EWERTON, E. & SOUZA, R.V. - A dengue no Rio de Janeiro: modelo clínico-laboratorial. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, **20**: 29, 1987.
16. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Dengue no Brasil - 1990**, Comparativo - RJ/CE/MS, 1990. Brasília, 1990.
17. NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FARIAS, M.F.D.B. & FARIAS FILHO, J.C. - Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **83**: 219-225, 1988.
18. NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E. & SCHATZMAYR, H.G. - Dengue virus type 2 outbreak in Rio de Janeiro. In: **Encontro Nacional de Virologia**, 5º, São Lourenço, 1990. Resumos, São Lourenço, Sociedade Brasileira de Virologia, 1990. p. 27.
19. OMS - **Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle**. Genebra, 1987.
20. OSANAI, C.H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; TANG, A.T.; AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D.C. & TAUIL, P.L. - Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. Nota prévia. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **23**: 53-54, 1983.
21. PINHEIRO, F.P. - Situação das arboviroses na Região Amazônica. In: **Simpósio Internacional sobre arbovírus dos trópicos e febres hemorrágicas**, Belém, 1980. **Resumos**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1982. p. 27-48.
22. SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.R. & TRAVASSOS DA ROSA, A.P. - An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**: 245-246, 1986.
23. SCHLESINGER, R.H. - **Dengue viruses**. New York, Springer-Verlag, 1977.
24. SEADE - **São Paulo em Números: Projeções Demográficas**. São Paulo, 1988. p. 163-179.
25. SHOPE, R.E. & SATHER, G.E. - Arboviruses. In: LENNETTE, E.H. & SCHIMDT, N.J., ed. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 5th ed. Washington, American Public Health Association, 1979. p. 767-814.
26. SOUZA, L.T.M.; PEREIRA, L.E.; KATZ, L.E.; ANDRADE, J.C.R.; CORTAZ, M.C.; OLIVEIRA, M. & BRASIL, M.T.L.R.F. - Dengue in Ribeiro do Valle: The first autochthonous cases in Sao Paulo State. In: **Encontro Nacional de Virologia**, 4º, São Lourenço, 1988. **Resumos**. São Lourenço, Sociedade Brasileira de Virologia, 1988. p. 41.
27. TESH, R.B. - A method for the isolation and identification of dengue viruses using mosquito cell cultures. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **28**: 1053-1059, 1979.

Recebido para publicação em 10/7/1991
Aceito para publicação em 22/11/1991