



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**DOSAGEM DA IgA SÉRICA POR ELISA DE CAPTURA PARA O
DIAGNÓSTICO DE DENGUE**

VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS

RECIFE-PE

2013

VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS

**DOSAGEM DA IgA SÉRICA POR ELISA DE CAPTURA PARA O DIAGNÓSTICO
DE DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre na área de Concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marli Tenório Cordeiro

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Recife- PE

2013

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

M827d Moraes, Viviane Martha Santos de.
 Dosagem da IgA sérica por ELISA de captura para o diagnóstico de
 dengue / Viviane Martha Santos de Moraes. – Recife: O autor, 2013.
 95 f. : il. tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

 Orientadora: Marli Tenório Cordeiro.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
 Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

 1. Dengue. 2. IgM. 3. ELISA. 4. Diagnóstico. I. Cordeiro, Marli Tenório.
 (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-086)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS

No dia 28 de fevereiro de 2013, às 08h30, na Sala de Aula do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, os Membros Doutores a **Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira – Presidente da Banca (UFPE)**, a **Profª. Drª. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque (ASCES)** e a **Profª. Drª. Laura Helena Vegas Gonzales Gil (CPqAM/FIOCRUZ)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS** sobre a sua Dissertação intitulada “**Dosagem da IgA sérica por ELISA de captura para o diagnóstico de dengue**”, o qual foi orientada pela **Profª. Drª. Marli Tenório Cordeiro (CPqAM/FIOCRUZ)** e a **Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira

APROVADA

Profª. Drª. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

Aprovada

Profª. Drª. Laura Helena Vegas Gonzales Gil

aprovada



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Ana Catarina de Souza Lopes

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Dedico aos meus pais, Cicero João de Moraes
e Marildes Maria dos Santos Moraes,
pelo amor incondicional ofertado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha irmã, que com amor, paciência e dedicação ensinaram-me a jamais desistir.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marli Tenório Cordeiro e à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho, por toda paciência e ensinamentos compartilhados.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho e contribuíram para sua realização.

A todos do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA/UFPE), do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE/CPqAM/FIOCRUZ) e da Pós-Graduação em Medicina Tropical que contribuíram para a minha formação.

A Jéfferson Almeida, Joanne Ferraz, Evônio Campelo e Georgea Cahú, meus grandes amigos e companheiros do Setor de Virologia do LIKA.

Aos amigos Washington Soares, Regina Cele, Bruna Melo, Phoeve Macário, Edclécia Moraes e Cristina Torres pela paciência, carinho e amizade.

À Deus.

Mais uma vez, os meus sinceros agradecimentos.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!”

Mais uma vez - Renato Russo

RESUMO

MORAIS, V.M.S. Dosagem da IgA sérica por ELISA de captura para o diagnóstico de dengue.

Introdução: O diagnóstico rápido, simples e preciso para confirmar a infecção pelo vírus dengue (DENV) é uma necessidade real, uma vez que a doença pode se manifestar com um amplo espectro de sinais e sintomas, similares a outros quadros febris agudos. Durante a infecção por dengue se verifica também a produção da imunoglobulina A (IgA) específica, que aumenta ao mesmo tempo que a imunoglobulina M (IgM), permanece positiva por um período de tempo mais curto e se apresenta em níveis mais elevados na infecção secundária. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de IgA no soro durante a infecção primária e secundária (sequencial) pelo DENV. **Metodologia:** Foram avaliadas amostras de soro por meio do teste imunoenzimático de captura da IgA (AAC-ELISA) *in house*. **Resultados:** Avaliou-se um total de 445 amostras de soro, sendo 171 caracterizados como infecção primária e 194 secundária; 40 amostras de indivíduos saudáveis negativos para dengue e 40 de vacinados contra febre amarela. As amostras foram distribuídas em 13 grupos. A positividade da IgA foi de 42,2% (154/365), sendo 27,5% (47/171) na infecção primária e 55,2% (107/194) na secundária. Na infecção secundária, a IgA foi detectada do 2º ao 4º dias de sintomas (grupo 1), antes mesmo da IgM, assim como no grupo 11 no qual a IgM não havia sido detectada (infecção secundária). Na infecção primária o maior valor da sensibilidade foi de 60,0 (36,4 - 80,0) no grupo com 30-35 dias de sintomas e na secundária foi de 87,5% (60,4 - 97,8), grupo com 8 dias de sintomas. A especificidade foi de 100% nas duas infecções (94,3 - 100). Ao aplicar o teste em paralelo para ambas técnicas observou-se um aumento global de 6,6% na sensibilidade do diagnóstico; sendo 2,7% para a infecção primária e de 15,2% para a secundária. A IgA não foi detectada nas amostras dos indivíduos saudáveis, nem nas amostras dos indivíduos recentemente vacinados contra febre amarela. **Conclusões:** A detecção da IgA demonstrou ser útil como forma de diagnóstico sorológico e em conjunto com a detecção da IgM poderá auxiliar na confirmação de casos agudos de dengue e na interpretação dos resultados de casos inconclusivos, permitindo a adoção de medidas preventivas para evitar a ocorrência de epidemias e ocorrência de casos graves e óbitos.

Palavras-chave: Dengue, IgA, IgM, ELISA, infecção primária, infecção secundária.

ABSTRACT

MORAIS, V.M.S. Determination of IgA capture ELISA for diagnosis of dengue.

Introduction: Diagnosis quick, simple and accurate to confirm infection by dengue virus (DENV) is a real need, since the disease can manifest with a broad spectrum of signs and symptoms similar to other acute febrile conditions. During dengue infection is also seen production of immunoglobulin A (IgA)-specific, which enhances the same time as immunoglobulin M (IgM) remains positive for a shorter time period and performs at higher levels in secondary infection. **Objective:** This study aimed to investigate the presence of serum IgA during primary infection and secondary (sequential) by DENV. **Methods:** We evaluated serum samples using the enzyme immunoassay capture of IgA (AAC-ELISA) in house. **Results:** We evaluated a total of 445 serum samples characterized as being 171 primary and 194 secondary infection; 40 samples were from healthy individuals negative for dengue and 40 vaccinated against yellow fever. The samples were divided into 13 groups. The positivity of IgA was 42.2% (154/365) and 27.5% (47/171) in primary infection and 55.2% (107/194) in the secondary. In secondary infection, IgA was detected 2nd to 4th days of symptoms (group 1), even before the IgM, in the group 11 in which IgM was not detected (secondary infection). In primary infection, the highest sensitivity was 60.0 (36.4 to 80.0) in the group with 30-35 days of symptoms and the secondary was 87.5% (60.4 to 97.8) group with 8 days of symptoms. The specificity was 100% in both infections (94.3 - 100). In applying the test in parallel for both techniques showed an overall increase of 6.6% in the sensitivity of diagnosis; being 2.7% for primary infection and 15.2% for secondary. IgA was not detected in samples from healthy subjects, nor in samples of individuals recently immunized against yellow fever. **Conclusions:** The detection of IgA proved to be a useful diagnostic serology and in conjunction with the detection of IgM may assist in confirming acute cases of dengue and interpretation of results inconclusive cases, allowing the adoption of preventive measures to avoid the occurrence epidemics and severe cases and deaths.

Keywords: Dengue, IgA, IgM, ELISA, primary infection, secondary infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do vírus dengue..... 19

Figura 2 - Representação esquemática dos métodos empregados no diagnóstico da dengue, conforme os dias de doença 23

Figura 3 - Representação esquemática da IgM e IgG conforme a infecção primária e secundária..... 25

ARTIGO

Fig. 1 - Detecção da IgA anti-DENV em casos de infecção primária (IP) e infecção secundária (IS) de acordo com o número de dias após o início dos sintomas..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras de soro em grupos, de acordo com o número de dias de sintomas e o tipo de infecção.....	32, 43
Tabela 2 - Distribuição dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA na infecção primária e na secundária pelo DENV	50
Tabela 3 - Distribuição dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA na infecção primária em relação ao número de dias após o início dos sintomas	51
Tabela 4 - Distribuição dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA na infecção secundária em relação ao número de dias após o início dos sintomas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC-ELISA	Ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgA
BSA	Albumina bovina fração V
cDNA	DNA complementar
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DENV	Vírus dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
E	Especificidade
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FHD	Febre hemorrágica da dengue
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IP	Infecção primária
IS	Infecção secundária
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM
NS1	Antígeno viral NS1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
S	Sensibilidade
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	Substrato tetra-metil-benzidina
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISAO DA LITERATURA.....	18
2.1 A dengue.....	19
2.2 Manifestações clínicas	19
2.3 Epidemiologia	20
2.4 Diagnóstico laboratorial.....	22
2.5 Resposta Imune.....	24
2.6 Imunoglobulina A.....	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Desenho do estudo	31
4.2 População de estudo.....	31
4.3 Definição do tamanho da amostra	31
4.4 Categorização das variáveis.....	32
4.5 Diagnóstico laboratorial para caracterização dos casos de dengue	33
4.6 Caracterização das amostras usadas como controle negativo.....	34
4.7 Caracterização do controle positivo.....	34
4.8 Ensaio imunoenzimático para detecção da IgA.....	35
4.9 Análise estatística.....	36
4.10 considerações éticas.....	37
5 RESULTADOS.....	38
Artigo – Aplicação do ensaio imunoenzimático de captura da imunoglobulina A (IgA) no diagnóstico sorológico da dengue.....	40
6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO.....	59
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

APÊNDICES.....	68
-----------------------	-----------

Apêndice A – Versão do artigo 1 em inglês

ANEXOS.....	88
--------------------	-----------

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE

Anexo B - Normas para publicação da revista científica

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico rápido, simples e preciso para confirmar a infecção pelo vírus dengue (DENV) é uma necessidade real, uma vez que a doença pode se manifestar com um amplo espectro de sinais e sintomas, similares a outros quadros febris agudos (OLIVEIRA et al., 2008). Os testes laboratoriais para diagnosticar infecções virais geralmente são baseados em métodos sorológicos, virológicos e moleculares. Embora mais sensíveis e precisos, os testes moleculares possuem custo mais elevado e necessitam de laboratórios especializados, razão pela qual os testes sorológicos são os mais utilizados na rotina (GUZMÁN et al., 2010). Para Blacksell et al. (2008), o uso de um teste preciso tem o propósito de auxiliar no manejo clínico dos pacientes, principalmente em regiões endêmicas, onde as infecções podem ocorrer dentro de um curto período de tempo.

Entre os testes sorológicos disponíveis, o ensaio imunoenzimático (ELISA) para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) permite realizar o diagnóstico presuntivo de infecção recente ou ativa, em amostra única de soro do paciente, sendo assim o método de eleição para a vigilância epidemiológica da dengue, uma vez que pode ser empregado durante um longo período, geralmente até 70-90 dias após o início dos sintomas (KUNO, GÓMEZ, GUBLER, 1987; GUZMÁN et al., 2010).

A IgM, geralmente, pode ser detectada a partir do quarto dia dos sintomas e nos casos de infecção primária a técnica é extremamente sensível. Entretanto, os resultados desta técnica devem ser interpretados com cuidado, pois em casos de infecção secundária (sequencial) a produção de anticorpos IgM ocorre em baixos níveis e nem sempre são detectáveis (GUZMÁN, KOURI, 1996; BALMASEDA et al., 2003).

O diagnóstico realizado apenas pelo MAC-ELISA tem limitações quando utilizados em regiões endêmicas, nas quais há uma elevada prevalência de anticorpos para dengue e circulação dos diversos sorotipos do vírus. Nessas regiões, nem sempre o achado de IgM é um indicativo de infecção aguda e recente, pois segundo alguns autores (CHEN, HWANG, FANG, 1991; GUZMÁN et al., 2010), a IgM pode permanecer por mais de oito meses após o início da doença. Às vezes é difícil interpretar um resultado positivo (IgM) para dengue em pacientes com doença febril, pois a presença de IgM pode refletir uma infecção de até oito meses anteriores. Nestes casos, é de fundamental importância a solicitação de uma segunda amostra de sangue para avaliação por outras técnicas sorológicas, como inibição da hemaglutinação e/ou teste de neutralização (GUZMÁN et al., 2010).

Durante a infecção aguda por dengue se verifica também a produção de IgA específica, tendo sido demonstrado que essa imunoglobulina aumenta ao mesmo tempo que a IgM, permanecendo positiva por um período de tempo mais curto e apresenta níveis mais elevados em infecções secundárias (TALARMIN et al. 1998; BALMASEDA et al. 2003; NAWA et al. 2005). Esse dado traz a possibilidade de que a detecção sorológica da IgA poderia ser mais sensível que a da IgM, mostrando a importância de sua detecção no diagnóstico de dengue (TALARMIN et al. 1998; BALMASEDA et al. 2003; NAWA et al. 2005).

Existe um pequeno número de estudos sobre a detecção e cinética da IgA como marcador sorológico na confirmação de casos de dengue. Além disso, não existe um consenso sobre a possibilidade de se diagnosticar um caso de dengue, por meio desta imunoglobulina. No entanto, por estudos já realizados, a detecção da IgA poderá constituir um parâmetro para confirmação desta infecção, principalmente nas infecções secundárias, uma vez que esta imunoglobulina aparece precocemente e se apresenta em níveis mais elevados neste tipo de infecção (TALARMIN et al. 1998; BALMASEDA et al. 2003; NAWA et al. 2005).

No Brasil, ainda não há estudos sobre o diagnóstico sorológico de dengue comparando a sensibilidade e especificidade da detecção da IgA e da IgM, por meio do AAC-ELISA e MAC-ELISA, respectivamente. Acredita-se que o emprego dos dois ensaios, em conjunto, poderá fornecer, além de informações úteis para a interpretação dos resultados, permitirá a confirmação de casos agudos e/ou recentes de dengue que poderão levar à adoção de condutas preventivas de modo a evitar a ocorrência de epidemias e consequentemente, dos casos graves.

Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a utilidade da detecção da IgA específica para o vírus dengue no soro, por meio ensaio imunoenzimático de captura da IgA (AAC-ELISA), como forma de auxiliar no diagnóstico laboratorial, e também avaliar se essa imunoglobulina representa um bom marcador para a detecção de casos agudos e/ou recentes de dengue.

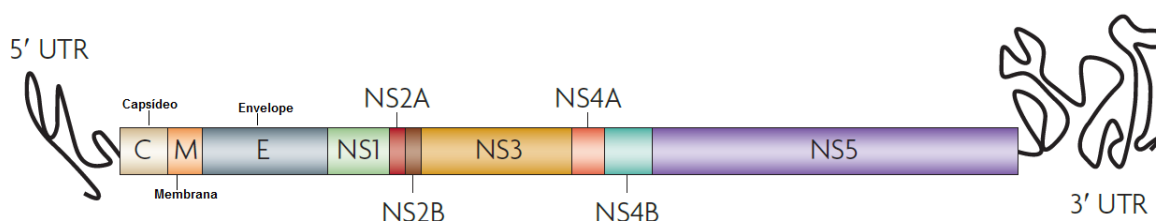
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A dengue

A dengue é uma infecção viral aguda de importância global em termos de morbidade e mortalidade, transmitida por artrópodes, principalmente o mosquito *Aedes aegypti*, infectado por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV) (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Mundialmente, é a doença mais importante causada por um arbovírus, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (PAULA, FONSECA, 2004).

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, apresentando-se como uma partícula esférica medindo 40-50 nm de diâmetro, com um envelope lipídico e RNA de fita simples, com polaridade positiva, possui um genoma de aproximadamente 11 kb que codifica três proteínas estruturais, o capsídeo, a membrana e o envelope, e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, conforme a figura 1 (GUZMAN et al. 2010).

Figura 1- Representação esquemática do genoma do vírus dengue.



Fonte: Adaptado de GUZMAN et al. 2010.

Os quatro sorotipos do vírus são geneticamente relacionados, porém antigenicamente distintos, causando manifestações clínicas similares, sendo transmitido ao ser humano por meio da picada de um mosquito infectado do gênero *Aedes*, sendo que o vetor mais importante nas epidemias é o *Aedes aegypti* (ROTHMAN, 2011).

2.2 Manifestações clínicas

A dengue pode ocorrer de forma assintomática ou sintomática. Ela se apresenta com uma grande variedade de sintomas, que vão desde a forma leve, febre do dengue, também chamada de dengue clássica, até a febre hemorrágica da

dengue/síndrome de choque da dengue. Manifestações clínicas, não usuais, também têm sido relatadas, como as manifestações neurológicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

A dengue em sua forma clássica é uma doença febril, não fatal, com duração de 5 a 7 dias. O período de incubação do vírus no homem pode variar de 3 a 14 dias, mas usualmente é de 5 a 7 dias. Os principais sinais e sintomas consistem de febre súbita, dor retro-orbitária associada com o movimento dos olhos e congestão conjuntival, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, exantema máculo-papular generalizado, prurido, astenia, náuseas, vômitos, dor abdominal, sabor metálico nos alimentos, mudança no estado psicológico, podendo ocorrer depressão pós-doença. Em alguns casos, ocorre um segundo pico de febre que pode durar dois a três dias, desaparecendo em seguida (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1995).

A grande maioria dos pacientes apresenta a forma leve da doença, a dengue clássica que tem uma evolução benigna. Em uma proporção menor dos casos, a doença apresenta evolução muito mais grave, como a febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue. Esta segunda forma da doença se caracteriza pelo aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas que podem evoluir para insuficiência circulatória e choque hipovolêmico (KORAKA et al. 2001; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

2.3 Epidemiologia

A dengue é uma das doenças infecciosas mais frequentes no Brasil e um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 2,5 bilhões da população mundial estão em risco de infecção, ocorrendo mais de 50 milhões de casos a cada ano (GUZMAN et al. 2010; WHITEHORN, SIMMONS, 2011).

No Brasil, a incidência tem aumentado desde 1986 devido às sucessivas epidemias (BARRETO et al. 2011) e no século XXI tornou-se, mundialmente, o país com o maior número de casos de dengue notificados (TEIXEIRA et al. 2009), com cerca de 6.642.936 casos notificados entre os anos de 1990 a 2011, destacando os anos de 2002 (696.472 casos), 2010 (1.011.548 casos) e 2011 (764.032 casos),

quando ocorreram as maiores epidemias registradas no Brasil (PENNA et al. 2011; BRASIL, 2013a).

Até 2009 circulavam no país os sorotipos 1, 2 e 3 do vírus, mas em 2010 o DENV-4 foi reintroduzido no país, tendo sido isolado em 2010 em Boa Vista, a capital do estado de Roraima (TEMPORÃO et al. 2011), com posterior disseminação nos estados do Amazonas, Pará, Piauí, Pernambuco, Bahia, Ceará, Rio de Janeiro e São Paulo (NOGUEIRA, EPPINGHAUS, 2011).

O primeiro surto de dengue em Pernambuco ocorreu em 1987 (DENV-1) com mais de dois mil casos notificados, porém esse surto foi logo controlado e só em 1995 ocorreu uma nova epidemia com a introdução do sorotipo 2 (CORDEIRO et al. 2007a). A partir de 2002 os três sorotipos (DENV-1, -2, -3) circularam simultaneamente, e nesse mesmo ano, o Estado de Pernambuco registrou sua maior epidemia de dengue (CORDEIRO et al. 2007b), com 99.652 casos, apresentando uma incidência de 1.235,7/100.000 habitantes (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b).

Em 2012 foi detectado o sorotipo 4 no estado de Pernambuco, conseqüentemente, um novo surto foi verificado em consequência da falta de imunidade da população para esse sorotipo, tendo sido notificados 12.236 casos na cidade do Recife (BRASIL, 2013a).

A circulação simultânea dos vários sorotipos, de acordo com a teoria da infecção sequencial, representa um fator de risco para a ocorrência da febre hemorrágica da dengue (FHD), devido à formação de imunocomplexos resultantes da presença de anticorpos heterólogos para dengue no indivíduo infectado por um novo sorotipo (TEIXEIRA et al. 2009). Em consequência da circulação simultânea de sorotipos do vírus foi registrado no Estado de Pernambuco, em 2002, o maior número de óbitos (20 casos) por FHD, seguido de 13 casos em 2011 (BRASIL, 2013c).

O aumento do número de casos de dengue preocupa as autoridades de saúde devido às dificuldades em controlar as epidemias e a necessidade de expandir os serviços de saúde para tratar os pacientes (TEIXEIRA et al. 2009). Três em cada quatro municípios brasileiros estão densamente povoados com o principal vetor da dengue, o *Aedes aegypti*, tornando-se difícil o controle desse mosquito, principalmente porque depende também da conscientização da população, para a redução e/ou eliminação de potenciais criadouros, além da necessidade de políticas públicas voltadas para as atividades de vigilância epidemiológica e vetorial, com

capacidade de monitoramento da circulação viral (GUBLER, 1998). Como não existe ainda uma vacina disponível para a população até o momento, apesar de haver algumas vacinas candidatas em fase de teste clínico, as perspectivas para o controle efetivo do dengue não são animadoras, considerando a dificuldade em se controlar a proliferação do vetor (BARRETO et al. 2011).

2.4 Diagnóstico laboratorial

A confirmação laboratorial da infecção pelo DENV é importante considerando que muitos dos sintomas da dengue são comuns a outras viroses, fazendo-se imprescindível o diagnóstico diferencial em muitos casos. Vários métodos podem ser empregados para o diagnóstico (Figura 2), como o isolamento do vírus em cultura de células, a detecção do RNA viral pela reação em cadeia da polimerase, associada à transcrição reversa (RT-PCR), a detecção da proteína NS1 (antígeno viral) no sangue e em tecidos (óbitos), além da detecção de anticorpos específicos no soro (GUZMÁN et al., 2010).

O isolamento viral pode ser realizado por meio da inoculação da amostra de sangue e/ou soro em culturas de células, principalmente as originadas de mosquito, como o clone C6/36 de *Aedes albopictus* (SHU, HUANG, 2004). Entretanto, essa técnica não é usada como um procedimento de rotina de diagnóstico em virtude da necessidade de pessoal e laboratório especializados e requer de uma a duas semanas para se obter o resultado (DATTA, WATTAL, 2004). No Brasil, o isolamento viral é realizado pelos Laboratórios de Saúde Pública de Referência em dengue, pertencente à Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Saúde.

O diagnóstico molecular realizado pela RT-PCR tem um papel fundamental porque é capaz de identificar de forma rápida a presença do vírus durante a fase aguda da doença (YAP, SIL, NG, 2011). Entretanto, a exigência de uma equipe treinada, a necessidade de vários equipamentos especiais, bem como o custo elevado associado aos métodos moleculares tem limitado sua aplicação como diagnóstico de rotina (DATTA, WATTAL, 2004).

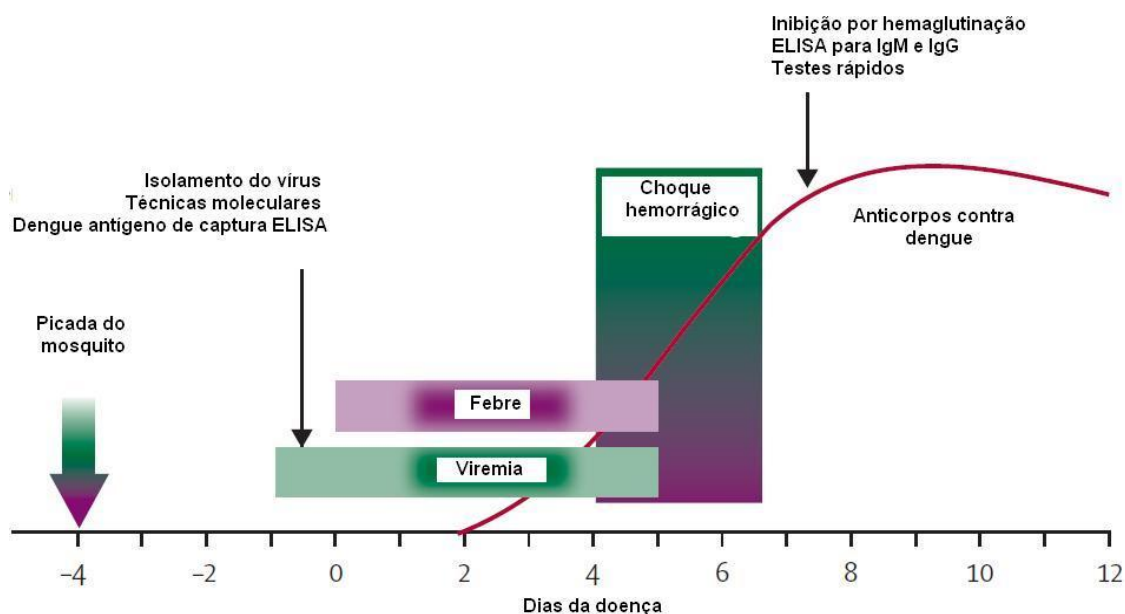
O diagnóstico sorológico pode ser feito por meio de vários métodos (inibição da hemaglutinação, teste de neutralização, etc), contudo, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é o método mais utilizado, sendo de grande utilidade devido a sua alta

sensibilidade e fácil execução, além de não exigir, necessariamente, duas amostras de soro como nos demais métodos (PAULA, FONSECA, 2004).

O ELISA tem sido usado para detectar anticorpos IgM na fase aguda e na convalescença, além dos anticorpos IgG anti-dengue. Entretanto, os anticorpos IgM são melhores detectados a partir do quinto dia após o início da doença, tornando essa técnica inviável para um diagnóstico precoce, ou seja, nos primeiros dias de doença (PAULA, FONSECA, 2004), apresentando também limitações que consistem nas variações da taxa de detecção durante a fase aguda da doença (LIMA et al. 2010).

A detecção do antígeno NS1, encontrado no soro ou plasma durante a fase aguda da doença, tem oferecido um novo caminho para o diagnóstico precoce e rápido ainda na fase aguda da infecção, podendo ser realizado pela maioria dos laboratórios públicos ou privados. Atualmente sua maior desvantagem é o custo mais elevado em relação aos testes para detecção de anticorpos (TRICOU et al. 2010).

Figura 2 - Representação esquemática dos métodos empregados no diagnóstico da dengue conforme os dias de doença.



Fonte: Adaptado de HALSTEAD, 2007.

2.5 Resposta Imune

Durante a infecção o pico da viremia ocorre após o surgimento dos primeiros sintomas, mesmo quando o paciente não apresenta manifestações clínicas que o faça procurar atendimento médico. Os vírus circulantes permanecem detectáveis geralmente até o quinto dia de doença, coincidindo com o período de elevação dos níveis de anticorpos, porém, em muitos casos é possível detectar o vírus até o sétimo dia de doença (GUBLER, 1998).

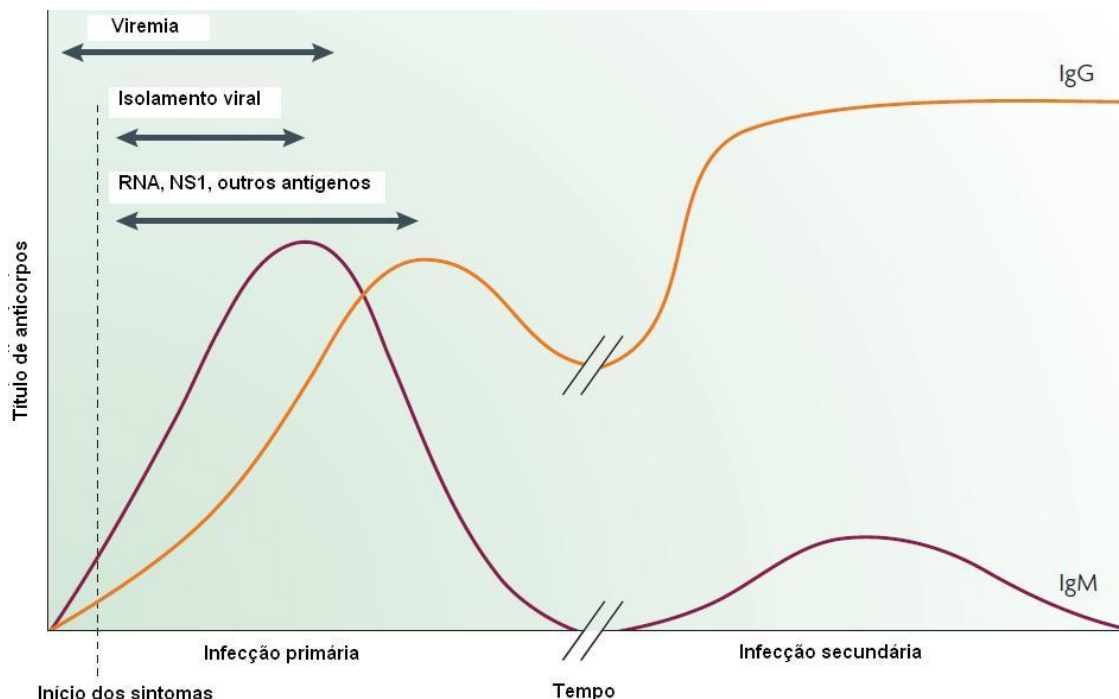
A resposta imune adquirida após a infecção pelo DENV consiste na produção da IgM, IgG e IgA, que são específicas principalmente para a proteína do envelope viral, e a intensidade da resposta varia dependendo do tipo de infecção (PEELING et al., 2010).

Dois padrões de resposta imune podem ser observados nas infecções agudas: a resposta primária, que ocorre em indivíduos que não são imunes ao vírus e a resposta secundária, que ocorre em indivíduos com infecção aguda pelo DENV e que já tiveram uma infecção anterior por outro sorotipo do vírus. Ressaltando que um indivíduo infectado com um sorotipo apresenta imunidade permanente ao vírus infectante, ou seja, não se infecta mais com o mesmo sorotipo do DENV (HALSTEAD, 2007).

De acordo com Halstead (2007), durante a infecção primária, a viremia coincide mais ou menos com a febre e é caracterizada por uma resposta lenta e de baixo título de anticorpos. A primeira imunoglobulina que surge é a IgM, enquanto que a IgG aparece com títulos baixos no final da primeira semana da doença e aumenta lentamente (Figura 3).

Já nas infecções secundárias, altos níveis de IgG são detectáveis, mesmo na fase aguda e aumentam nas duas semanas seguintes. A cinética da resposta da IgM é mais variada, aparecendo mais tarde durante a fase febril da infecção secundária e é precedida por IgG, ressaltando-se que algumas sorologias negativas para IgM são observadas nestas infecções (GUZMÁN, KOURÍ, 2004).

Figura 3 - Representação esquemática da IgM e IgG conforme a infecção primária e secundária.



Fonte: Adaptado de PEELING et al., 2010.

Após a febre e mal-estar causados pelo DENV, geralmente os pacientes procuram atendimento médico nos primeiros dias de febre e nesta fase o diagnóstico só é possível por meio da detecção do vírus, do RNA viral ou da proteína não estrutural NS1 (antígeno viral) presentes no sangue. O diagnóstico sorológico pela detecção de IgM é difícil de ser feito até a redução da febre e quando realizado neste período, se a IgM for negativa deve ser solicitada uma segunda amostra de sangue, coletada após o término da febre, na fase convalescente. Outros testes sorológicos, como o de inibição da hemaglutinação e o teste de neutralização exigem amostras pareadas de soro, o que nem sempre é possível se obter (GUZMÁN, KOURÍ, 2004; PEELING et al., 2010).

2.6 Imunoglobulina A

Na infecção pelo DENV a IgA é produzida quase ao mesmo tempo que a IgM e pode ser igualmente detectada no sangue, podendo, portanto, ser empregada para fins de diagnóstico.

Na Guiana Francesa, Talarmin et al. (1998), utilizando as técnicas do MAC-ELISA e AAC-ELISA em 178 amostras de soros (37 infecção primária e 25 infecção secundária) observaram que a positividade para IgA anti-DENV ocorreu em média um dia após o aparecimento da IgM. Porém o tipo de infecção não foi estabelecido para a maior parte das amostras ($n = 116$), conforme os critérios utilizados pelos autores. Observaram o pico da produção da IgA no 8º dia, diminuindo mais rápido do que o da IgM, não sendo encontrada após 40 dias do início dos sintomas. No entanto, o valor preditivo positivo e a especificidade do AAC-ELISA foram de 100% nos soros de referência, já a sensibilidade e o valor preditivo negativo foram de 100% apenas entre o 6º e 25º dia após o início da infecção, o que sugere que a presença do IgA é um indicador de infecção ocorrida dentro deste período.

Posteriormente, Balmaseda et al. (2003) ao analisarem apenas as infecções secundárias pelo DENV, na Nicaragua, verificaram que a detecção de IgA no soro ocorre antes da IgM em relação ao início dos sintomas e em níveis mais elevados, indicando que a pesquisa desta imunoglobulina pode ser útil na detecção de infecção secundária. Também encontraram uma sensibilidade de 94,4%, especificidade de 74,7%, valor preditivo positivo de 78,2% e valor preditivo negativo de 93,3%. Todavia, indicaram que a detecção IgA no soro pode ser uma outra alternativa viável para o diagnóstico de infecção por DENV.

Vázquez et al. (2005) também obtiveram um percentual de detecção da IgA mais elevado nos casos secundários. Ao avaliarem 127 amostras de soro coletadas entre o 5º e 7º dia após o início da febre, dos quais 42 foram classificados como dengue primária, 48 como secundário de dengue clássico e 37 casos secundários de FHD, obtiveram resultados positivos para IgA de: 23,8% (10/42), 85,4% (41/48) e 56,8% (21/37), respectivamente.

Ahmed et al. (2010) avaliando um teste rápido para IgA (ASSURE® Dengue IgA Rapid Test) em 58 amostras de pacientes com infecção primária, 121 com infecção secundária e 245 pacientes negativos para dengue, verificaram uma sensibilidade total de 99,4% (178/179); 100% na infecção primária (58/58) e 99,2% (120/121) na infecção secundária, sendo a especificidade de 99,2%.

Tan et al. (2011) utilizando o mesmo teste rápido obtiveram uma sensibilidade e especificidade global de 86,70% (202/233) e 86,05% (586/681), respectivamente. Por outro lado, encontraram uma sensibilidade de 77,42% (72/93), na infecção primária e 92,86% (130/140) na secundária.

Hernández et al. (2012) utilizando o teste rápido para IgA (ASSURE®) em 172 amostras de pacientes com dengue encontraram uma positividade de 61%. Estes autores ao avaliarem a positividade após os dias de sintomas, encontraram os valores de 33,3% (4/12) nos soros coletados no mesmo dia do início da febre e de 81,2% (23/28) nas amostras coletadas cinco dias após o início da febre. Classificaram 143 casos como infecção primária e 29 secundária, dessa forma encontraram uma sensibilidade e especificidade global de 85,1% e 61,0%, respectivamente.

Da mesma forma, Hernández et al. (2012) analisaram 47 amostras de doadores de sangue negativos para dengue e o teste rápido apresentou 7 (14,9%) amostras positivas, uma especificidade de 85,1%. Por outro lado, ao avaliarem um soro de paciente com febre amarela e cinco soros de vacinados contra febre amarela obtiveram resultado negativo, sugerindo que os anticorpos contra a febre amarela não são detectados pelo teste rápido.

As pesquisas até então realizadas utilizando a IgA como forma de confirmar casos de dengue sugerem que o emprego das imunoglobulinas M e A, em conjunto, poderão fornecer informações úteis no diagnóstico laboratorial da dengue.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estimar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do ensaio imunoenzimático de captura de IgA específica na infecção primária e secundária pelo vírus dengue.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a frequência da IgA no soro utilizando o AAC-ELISA durante a infecção primária e secundária pelo DENV;
- Estimar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA segundo os dias de sintomas na infecção primária e secundária;
- Estimar a especificidade do AAC-ELISA frente às amostras negativas para dengue e após a vacinação contra febre amarela;
- Comparar a detecção da IgA e IgM segundo os dias de sintomas na infecção primária e secundária;
- Estimar a sensibilidade da aplicação em paralelo dos ensaios em conjunto para a detecção da IgM e IgA na infecção primária e secundária.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo transversal, utilizando grupos de comparação.

4.2 População de estudo

Foram incluídas neste estudo 445 amostras de soro humano do banco de amostras biológicas provenientes de projetos de pesquisas desenvolvidos no Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz. Sendo 365 amostras de casos confirmados de dengue, 40 soros de indivíduos saudáveis negativos para dengue e 40 soros de indivíduos saudáveis vacinados contra o vírus da febre amarela, com IgM anti-febre amarela.

4.3 Definição do tamanho da amostra

Considerando que anticorpos IgM anti-dengue desenvolvem-se rapidamente, podendo ser detectados em cerca de 80% dos pacientes com cinco dias de doença, e tomando como base esta prevalência, com o erro aceitável de 5 % e o intervalo de confiança de 95 %, a amostra foi determinada em 246 soros. Entretanto, devido à disponibilidade do banco de amostras biológicas (previamente caracterizadas) do LaViTE, optou-se por utilizar um total de 445 soros distribuídos em 13 grupos. As 365 amostras positivas para dengue foram divididas em 11 grupos, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das amostras de soro em grupos, de acordo com o número de dias após o início da febre e o tipo de infecção.

Grupos	Dias após o início dos sintomas	Presença da IgM	Tipo de infecção		
			IP (N=171)	IS (N=194)	Total (N=365)
1 [#]	2-4	Não	17	15	32
2	5	Sim	17	19	36
3	6	Sim	16	15	31
4	7	Sim	19	19	38
5	8	Sim	17	16	33
6	9	Sim	15	16	31
7	10	Sim	16	17	33
8	15-20	Sim	16	21	37
9	30-35	Sim	20	17	37
10	45-50	Sim	18	14	32
11 [#]	10 - 21	Não	-	25	25

[#]Casos de dengue com IgM negative, mas com isolamento do vírus e/ou RT-PCT positivo; IP = infecção primária; IS = infecção secundária; N = número de soros testados.

Distribuição das amostras de soro em grupos, de acordo com o número de dias de sintomas e o tipo de infecção.

Adicionalmente, foram incluídos dois grupos como controles negativos para comparação: o grupo 12, composto por amostras de 40 indivíduos saudáveis, negativos para dengue e o grupo 13 formado por amostras dos mesmos indivíduos coletadas após a vacinação contra febre amarela e que possuem IgM positiva para este vírus, com a finalidade de avaliar a ocorrência de reação cruzada (falso positivo para IgA anti-dengue). As amostras de soro encontravam-se estocadas a -20° C, em pequenas alíquotas.

4.4 Categorização das variáveis

- Dependente: IgA. Definição: detecção da IgA no soro. Categorização: Presente/Ausente.
- Independente: dias. Definição: dias após os sintomas. Categorização: de 02 a 50 dias.

4.5 Diagnóstico laboratorial para caracterização dos casos de dengue

Indivíduos com suspeita clínica de dengue atendidos em hospitais públicos e privados da cidade do Recife tiveram amostras de sangue coletadas durante a fase aguda da doença, na convalescença e após esse período, constituindo uma coorte clínica de pacientes para pesquisas sobre a dengue, conforme descrito por Cordeiro et al. (2007). De forma sucinta, o diagnóstico laboratorial para confirmação e caracterização dos casos de dengue foi realizado conforme descrito a seguir:

Para o isolamento dos vírus foi utilizada a linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (IGARASHI, 1978), utilizando-se o meio Leibovitz L15 (GIBCO, Invitrogen Co., Grand Island, New York), com 5% de soro fetal bovino para o meio de crescimento e com 2% para o meio de manutenção. Os vírus isolados foram identificados por meio da técnica de imunofluorescência indireta (HENCHAL et al., 1982), utilizando-se anticorpos monoclonais para o quatro sorotipos do DENV (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

O diagnóstico molecular foi realizado por meio da reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR). A extração do RNA viral do soro foi feita utilizando-se o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, EUA). Para a detecção do RNA viral e identificação do vírus foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992). Nesta técnica são utilizados iniciadores (*primers*) universais do vírus dengue localizados nos genes C e prM e o sorotipo é identificado mediante o uso de *primers* sorotipo-específico em um semi-nested PCR em uma segunda amplificação.

Para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram utilizados os kits ELISA da PANBIO, captura de IgM anti-dengue e o ELISA IgG anti-dengue (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Australia) e os ensaios realizados e interpretados conforme recomendado pelo fabricante.

A caracterização do tipo de resposta imune do paciente à infecção pelo vírus dengue, em primária e secundária, foi feita baseada na cinética dos anticorpos das classes IgM e IgG, de acordo com os seguintes critérios:

A) *Infecção Primária* foi definida pela ausência de anticorpos IgG anti-dengue na amostra de soro coletada durante a fase aguda da doença, enquanto IgM estava presente; e/ou isolamento de vírus e/ou RT-PCR positivos. Na segunda amostra

coletada na fase convalescente, anticorpos IgG anti-dengue eram detectados, sendo observada conversão sorológica.

B) *Infecção secundária* foi definida pela detecção de anticorpos IgG anti-dengue na amostra de soro coletada na fase aguda da doença e ausência de IgM anti-dengue, associada (ou não) com isolamento de vírus e/ou RT-PCR positivos, em alguns casos. Na amostra de soro coletada na fase convalescente eram detectados anticorpos IgM específicos (CORDEIRO et al, 2007b).

4.6 Caracterização das amostras usadas como controles negativos

As amostras de soro utilizadas como grupo controle negativo foram obtidas de indivíduos saudáveis antes de receberem a vacina contra febre amarela (n=40), com nova coleta dos mesmos indivíduos 30 a 60 dias após a vacinação (n=40; IgM e IgG positivos para febre amarela), e se encontram estocadas a -20° C no banco de amostras biológicas do LaViTE. Essas amostras foram previamente testadas para presença de anticorpos IgM anti-dengue; ELISA IgM e IgG para o vírus febre amarela e ao teste de neutralização por redução de placas para febre amarela, conforme descritos em Melo et al. (2011).

Além destas amostras foi utilizado como controle negativo do teste, em todos os experimentos, um pool de soros negativos para dengue, febre amarela, rubéola, sarampo e parvovírus.

4.7 Caracterização do controle positivo

Para obtenção das amostras de soros IgA positivas para o DENV, utilizadas como controle positivo nos ensaios, foram triadas 20 amostras de soro IgM- positivas para dengue por meio do teste rápido imunocromatográfico ASSURE® Dengue IgA Rapid Test (MP Diagnostics). Obteve-se 11 amostras IgA positivas, das quais foi feito um pool de seis soros e estocados à -20° C em pequenas alíquotas.

4.8 Ensaio imunoenzimático para detecção da IgA

O ensaio imunoenzimático para captura de IgA *in house* (AAC-ELISA) utilizado no estudo baseou-se no protocolo do MAC-ELISA desenvolvido por Kuno, Gómez, Gubler (1987), com algumas modificações.

Sensibilização da microplaca

Na primeira etapa do ensaio microplacas de poliestireno com 96 poços foram lavadas com uma solução de salina tamponada (PBS) com 0,05% de Tween. Em seguida foram sensibilizadas com 100µl de anti-IgA humana (SIGMA) diluída em tampão carbonato pH 9.0, contendo 2µg/poço e incubadas por 24 horas a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte realizou-se cinco lavagens com PBS/0,05% Tween.

Bloqueio dos sítios inespecíficos

A segunda etapa consistiu no bloqueio de sítios inespecíficos com a adição de 200 µl da solução de PBS com 4% de albumina bovina fração V (BSA)-(INLAB) nas microplacas e incubação à temperatura ambiente, em câmara úmida, por 30 minutos, sendo em seguida lavadas quatro vezes com PBS/0,05% Tween.

Adição das amostras

Amostras de soro, controle positivo e negativo foram diluídos 1:10 em PBS pH 7.4 com 1% BSA (diluyente do teste) e 50µl dessas amostras foram dispensadas na microplaca, em duplicata. Dois orifícios foram destinados ao branco contendo 50µl do diluyente, em seguida a microplaca foi incubada por 1 h a 37°C, em câmara úmida, com posterior lavagem.

Adição dos antígenos

Foram utilizados antígenos para cada sorotipo do DENV produzidos em cérebro de camundongos (extraídos por acetona), pelo Serviço de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas (Ministério da Saúde), em Belém (PA), gentilmente cedidos por Dr. Pedro Vasconcelos. Os antígenos foram previamente titulados, individualmente, para determinar a diluição ótima dos mesmos. Na reação foi utilizado um pool dos quatro antígenos diluídos (1/30) em PBS/1% BSA e

dispensados 50µl por poço, incubação por 1 h a 37°C, em câmara úmida, seguida de cinco lavagens.

Adição do anticorpo secundário (conjugado à peroxidase)

Foram dispensados 25µl (por poço) do anticorpo secundário anti-flavivírus (MAB 6B6C-1), (CDC, Estados Unidos), previamente titulado, diluído 1/13.000 em PBS /1% BSA, seguida de incubação por 1 h a 37°C e cinco lavagens após esse tempo.

Adição do substrato

Foram adicionados à microplaca 100µl do substrato tetra-metil-benzidina (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Após esse tempo a reação foi parada com a adição de 100µl / poço de uma solução de H₂SO₄ a 12,5%. A leitura da densidade óptica (DO) das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Rad Laboratories, Inc.), utilizando filtro de 450 nm.

Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados foi calculado um valor de index com base no seguinte cálculo: média da absorbância do soro-teste / média da absorbância do controle negativo. Foram consideradas positivas (reagentes) as amostras que apresentaram o valor do índice maior que dois e negativas (não reagentes) aquelas com valor de index igual ou menor que dois. As amostras com resultado indeterminado foram repetidas.

4.9 Análise estatística

Os resultados das leituras obtidas no AAC-ELISA foram armazenados numa planilha Excel. A análise estatística foi realizada no software Epi-Info 6.04d. Foi aplicado o teste qui-quadrado, admitindo um $p < 0,05$ para avaliar a significância da detecção da IgA na infecção primária e secundária. Adicionalmente foi aplicado o teste em paralelo para estimar a sensibilidade do MAC e AAC-ELISA em conjunto.

4.10 considerações éticas

As amostras de soro utilizadas nesta pesquisa pertencem ao banco de amostras biológicas do LaViTE/CPqAM, provenientes de pacientes com diagnóstico de dengue utilizados em projetos de pesquisa desse departamento, não havendo necessidade de coletar novas amostras.

Os integrantes do banco de amostras biológicas haviam assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz. Porém, para a realização do presente estudo, foi submetido também ao Comitê de ética da UFPE e aprovado sob o Nº 510/11 (Anexo A).

5 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico que será submetido ao periódico Diagnostic Microbiology and infectious Disease, qualis B1. Medicina II.

Artigo

Aplicação do ensaio imunoenzimático de captura da imunoglobulina A (IgA) no diagnóstico sorológico da dengue

Viviane Martha Santos de Moraes^{a,b}, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{b,c}, Ana Isabel Vieira Fernandes^d, Jéfferson Luis de Almeida Silva^{a,b}, Verônica Gomes da Silva^e, Marli Tenório Cordeiro^{e, f}

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil; ^bSetor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil; ^cDepartamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; ^dDepartamento de Promoção da Saúde do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba; ^eLaboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE Brasil; ^fLaboratório Central de Saúde Pública, Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

Resumo

Pesquisou-se a IgA anti-DENV pelo ELISA de captura de IgA (AAC-ELISA) *in house*, em 171 soros de casos de infecção primária (IP) e 194 de secundária (IS), distribuídos de acordo com dias de sintomas. A sensibilidade geral do teste foi de 42,2% (154/365), com maior positividade na IS em relação à IP (55,2% vs. 27,5%; $p = 0,000$); e especificidade de 100%. Na infecção secundária a IgA foi detectada 2 a 4 dias após o início dos sintomas, antes da IgM, assim como em amostras com 10 a 21 dias, sem IgM. Observou-se maior sensibilidade na IP (60,0%) 30-35 dias após o início dos sintomas e na IS com 8 dias (87,5%). A detecção de IgM e IgA em

paralelo aumentou a sensibilidade do diagnóstico sorológico, em particular na IS, de 79,4% para 94,6%. Não se observou resultado falso-positivo. O AAC-ELISA demonstrou ser útil para confirmar casos de dengue e utilizada em paralelo com a IgM aumentou a sensibilidade do diagnóstico sorológico, de 84,4% (IgM) para 91,0% (IgM + IgA).

1. Introdução

A dengue é uma doença viral aguda, causada por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV), que pode se manifestar com um amplo espectro de sinais e sintomas, similares a outros quadros febris agudos (Oliveira et al., 2008).

Na dengue podem ser observados dois padrões de resposta imune: a infecção primária, que ocorre em indivíduos que não são imunes a nenhum dos quatro sorotipos do vírus e a infecção secundária, quando o indivíduo foi re-infectado por um sorotipo do DENV diferente do da infecção anterior (Halstead, 2007).

De acordo com Halstead (2007), durante a infecção primária a viremia coincide com a febre, sendo caracterizada por uma resposta lenta e com baixo título de anticorpos. A primeira imunoglobulina que surge é a IgM, enquanto que a IgG aparece em títulos baixos no final da primeira semana da doença e aumenta lentamente. Já nas infecções secundárias, são detectáveis altos níveis de IgG, mesmo na fase aguda e aumentam nas duas semanas consecutivas.

Na fase aguda da infecção a dengue pode ser diagnosticada pela detecção do RNA viral por meio da reação em cadeia da polimerase associada à transcriptase reversa (RT-PCR), pelo isolamento do vírus, ou pela detecção do antígeno NS1. Entretanto, o ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) é o mais comumente utilizado e permite realizar o diagnóstico

presuntivo de infecção recente ou ativa. Utiliza-se uma amostra única de soro do paciente e pode ser empregado até 70 a 90 dias após o início dos sintomas (Guzmán et al., 2010; Kuno, Gómez, Gubler, 1987).

O diagnóstico de dengue realizado apenas pela detecção da imunoglobulina M (IgM) apresenta limitações quando utilizado em regiões endêmicas, nas quais há elevada prevalência e circulação dos diversos sorotipos do vírus, e, nem sempre, a detecção da IgM indica uma infecção aguda e recente. Por outro lado, os resultados desta técnica devem ser interpretados com cautela, pois a presença de IgM pode refletir uma infecção ocorrida até oito meses anteriores (Chen, Hwang, Fang, 1991) e em alguns casos de infecção secundária (sequencial), a produção da IgM encontra-se em baixos níveis e às vezes não detectáveis (Balmaseda et al., 2003; Guzmán, Kouri, 1996).

Na infecção pelo vírus dengue a imunoglobulina A (IgA) é produzida simultaneamente à IgM e pode ser igualmente detectada no sangue, podendo, portanto, ser empregada para fins de diagnóstico. Segundo alguns estudos, a detecção da IgA anti-DENV pode ocorrer antes da IgM e decresce mais rápido que a IgM, não sendo encontrada após 40 dias do início dos sintomas (Balmaseda et al., 2003; Talarmin et al., 1998).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo estimar a sensibilidade e especificidade do AAC-ELISA na detecção da IgA anti-DENV, assim como avaliar se essa imunoglobulina representa um bom marcador para auxiliar no diagnóstico laboratorial da doença.

2. Material e Métodos

2.1. População de estudo e tamanho da amostra

Foram incluídas neste estudo 445 amostras de soro do banco de amostras biológicas do Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife-PE, Brasil. Foram avaliadas 365 amostras de indivíduos com suspeita clínica de dengue atendidos em hospitais públicos e privados da cidade do Recife, confirmados como dengue, conforme descrito por Cordeiro et al. (2007), distribuídas em 11 grupos, de acordo com o número de dias de sintomas, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1

Distribuição das amostras de soro em grupos, de acordo com o número de dias após o início da febre e o tipo de infecção

Grupos	Dias após o início dos sintomas	Presença da IgM	Tipo de infecção		
			IP (N=171)	IS (N=194)	Total (N=365)
1 [#]	2-4	Não	17	15	32
2	5	Sim	17	19	36
3	6	Sim	16	15	31
4	7	Sim	19	19	38
5	8	Sim	17	16	33
6	9	Sim	15	16	31
7	10	Sim	16	17	33
8	15-20	Sim	16	21	37
9	30-35	Sim	20	17	37
10	45-50	Sim	18	14	32
11 [#]	10 - 21	Não	-	25	25

[#]Casos de dengue com IgM negativa, mas com isolamento do vírus e/ou RT-PCT positivo; IP = infecção primária; IS = infecção secundária; N = número de soros testados.

Adicionalmente, foram incluídos dois grupos de controles negativos para comparação: o grupo 12, composto por amostras de 40 indivíduos saudáveis, negativos para dengue e o grupo 13 composto por amostras dos mesmos indivíduos coletadas após a vacinação contra febre amarela, com IgM positiva para esse vírus, com a finalidade de avaliar a ocorrência de reação cruzada. As amostras de soro encontravam-se estocadas a -20° C, em pequenas alíquotas.

2.2. Caracterização das amostras dos casos de dengue

De forma sucinta, o diagnóstico laboratorial para confirmação e caracterização dos casos de dengue foi realizado conforme descrito a seguir:

Para o isolamento dos vírus foi utilizada a linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (Igarashi, 1978), utilizando-se o meio Leibovitz L15 (GIBCO, Invitrogen Co., Grand Island, New York), com 5% de soro fetal bovino para o meio de crescimento e com 2% para o meio de manutenção. Os vírus isolados foram identificados por meio da técnica de imunofluorescência indireta (Henchal et al., 1982), utilizando-se anticorpos monoclonais para o quatro sorotipos do DENV (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

O diagnóstico molecular foi realizado por meio da reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR). A extração do RNA viral do soro foi feita utilizando-se o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, EUA). Para a detecção do RNA viral e identificação do vírus foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992). Nesta técnica são utilizados iniciadores (*primers*) universais do vírus dengue localizados nos genes C e prM e o sorotipo é identificado mediante o uso de *primers* sorotipo-específico em um semi-nested PCR em uma segunda amplificação.

Para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram utilizados os kits ELISA da PANBIO, captura de IgM anti-dengue e o ELISA IgG anti-dengue (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Australia) e os ensaios realizados e interpretados conforme recomendado pelo fabricante.

A caracterização do tipo de resposta imune do paciente à infecção pelo vírus dengue, em primária e secundária, foi feita baseada na cinética dos anticorpos das classes IgM e IgG, de acordo com os seguintes critérios: A) *Infecção Primária* foi definida pela ausência de anticorpos IgG anti-dengue na amostra de soro coletada durante a fase aguda da doença, enquanto IgM estava presente; e/ou isolamento de vírus e/ou RT-PCR positivos. Na segunda amostra coletada na fase convalescente, anticorpos IgG anti-dengue eram detectados, sendo observada conversão sorológica. B) *Infecção secundária* foi definida pela detecção de anticorpos IgG anti-dengue na amostra de soro coletada na fase aguda da doença e ausência de IgM anti-dengue, associada (ou não) com isolamento de vírus e/ou RT-PCR positivos, em alguns casos. Na amostra de soro coletada na fase convalescente eram detectados anticorpos IgM específicos (CORDEIRO et al, 2007).

2.3. Caracterização dos controles negativos

As amostras de soro utilizadas como grupo controle negativo foram obtidas de indivíduos saudáveis antes de receberem a vacina contra febre amarela (n=40), com nova coleta dos mesmos indivíduos 30 a 60 dias após a vacinação (n=40; com IgM e IgG positivos para febre amarela). Essas foram submetidas a ensaios para detecção de anticorpos IgM anti-dengue; ELISA IgM e IgG para o vírus febre amarela e ao teste de neutralização por redução de placas para febre amarela, conforme descritos em Melo et al. (2011). Além dessas amostras foi utilizado como

controle negativo do teste, em todos os experimentos, um pool de soros negativos para dengue, febre amarela, rubéola, sarampo e parvovírus.

2.4. Caracterização do controle positivo

Para obtenção de amostras de soros IgA positivas para dengue, utilizadas como controle positivo nos ensaios, foram triadas 40 amostras de soro IgM positivas para dengue por meio do teste rápido imunocromatográfico ASSURE® Dengue IgA Rapid Test (MP Diagnostics), das quais 13 amostras foram positivas, foi feito um pool de seis soros e estocados à -20° C em pequenas alíquotas.

2.5. Ensaio imunoenzimático para detecção da IgA

O ensaio imunoenzimático para captura de IgA *in house* (AAC-ELISA) utilizado no estudo baseou-se no protocolo do MAC-ELISA desenvolvido por Kuno, Gómez, Gubler (1987), com algumas modificações.

Sensibilização da microplaca - Na primeira etapa do ensaio microplacas de poliestireno com 96 poços foram lavadas com uma solução de salina tamponada (PBS) com 0,05% de Tween. Em seguida foram sensibilizadas com 100µl de anti-IgA humana (SIGMA) diluída em tampão carbonato pH 9.0, contendo 2µg/poço e incubadas por 24 horas a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte realizou-se cinco lavagens com PBS/0,05% Tween.

Bloqueio dos sítios inespecíficos - A segunda etapa consistiu no bloqueio de sítios inespecíficos com a adição de 200 µl da solução de PBS com 4% de albumina bovina fração V (BSA)-(INLAB) nas microplacas e incubação à temperatura

ambiente, em câmara úmida, por 30 minutos, sendo em seguida lavadas quatro vezes com PBS/0,05% Tween.

Adição das amostras - Amostras de soro, controle positivo e negativo foram diluídos 1:10 em PBS pH 7.4 com 1% BSA (diluyente do teste) e 50µl dessas amostras foram dispensadas na microplaca, em duplicata. Dois orifícios foram destinados ao branco contendo 50µl do diluyente, em seguida a microplaca foi incubada por 1 h a 37°C, em câmara úmida, com posterior lavagem.

Adição dos antígenos - Foram utilizados antígenos para cada sorotipo do DENV produzidos em cérebro de camundongos (extraídos por acetona), pelo Serviço de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas (Ministério da Saúde), em Belém (PA), gentilmente cedidos por Dr. Pedro Vasconcelos. Os antígenos foram previamente titulados, individualmente, para determinar a diluição ótima dos mesmos. Na reação foi utilizado um pool dos quatro antígenos diluídos (1/30) em PBS/1% BSA e dispensados 50µl por poço, incubação por 1 h a 37°C, em câmara úmida, seguida de cinco lavagens.

Adição do anticorpo secundário - Foram dispensados 25µl (por poço) do anticorpo secundário anti-flavivírus (MAB 6B6C-1), conjugado à peroxidase (CDC, Estados Unidos), previamente titulado, diluído 1/13.000 em PBS /1% BSA, seguida de incubação por 1 h a 37°C e cinco lavagens após esse tempo.

Adição do substrato - Foram adicionados à microplaca 100µl do substrato tetra-metil-benzidina (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences) e incubadas por 30

minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Após esse tempo a reação foi parada com a adição de 100µl / poço de uma solução de H₂SO₄ a 12,5%. A leitura da densidade óptica (DO) das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Rad Laboratories, Inc.), utilizando filtro de 450 nm.

Interpretação dos resultados - Para a interpretação dos resultados foi calculado um valor de index com base no seguinte cálculo: média da absorbância do soro-teste / média da absorbância do controle negativo. Foram consideradas positivas (reagentes) as amostras que apresentaram o valor do index maior que dois e negativas (não reagentes) aquelas com valor de index igual ou menor que dois. As amostras com resultado indeterminado foram repetidas.

2.6. Análise estatística

Os resultados das leituras obtidas no AAC-ELISA foram armazenados numa planilha Excel. A análise estatística foi realizada no software Epi-Info 6.04d. Foi aplicado o teste qui-quadrado, admitindo um $p < 0,05$ para avaliar a significância da detecção da IgA na infecção primária e secundária. Adicionalmente foi aplicado o teste em paralelo para estimar a sensibilidade da detecção da IgM e IgA em conjunto.

3. Resultados

As 365 amostras dos casos confirmados de dengue (por isolamento viral, RT-PCR e/ou detecção da IgM/IgG), incluídas neste estudo apresentaram uma positividade global para IgA de 42,2% (154/365) com maior frequência na infecção secundária quando comparada à infecção primária (55,2% (107/194) vs. 27,5%

(47/171); $p = 0,000$). Em adição, o AAC-ELISA foi 2 vezes (55,2/27,5) mais sensível na infecção secundária quando comparada à primária. A positividade para a IgM foi de 84,38% (308/365).

A figura 1 apresenta a distribuição dos casos positivos para IgA de acordo com dias de sintomas, na infecção primária e na secundária. O maior percentual de positividade da IgA na infecção primária ocorreu entre o 30º e 35º dias de sintomas, enquanto que na infecção secundária se verificou no 8º dia de sintomas. A partir do 45º dia de sintomas (grupo 10) a IgA não foi mais detectada, apenas uma amostra foi positiva (1/18) na infecção primária.

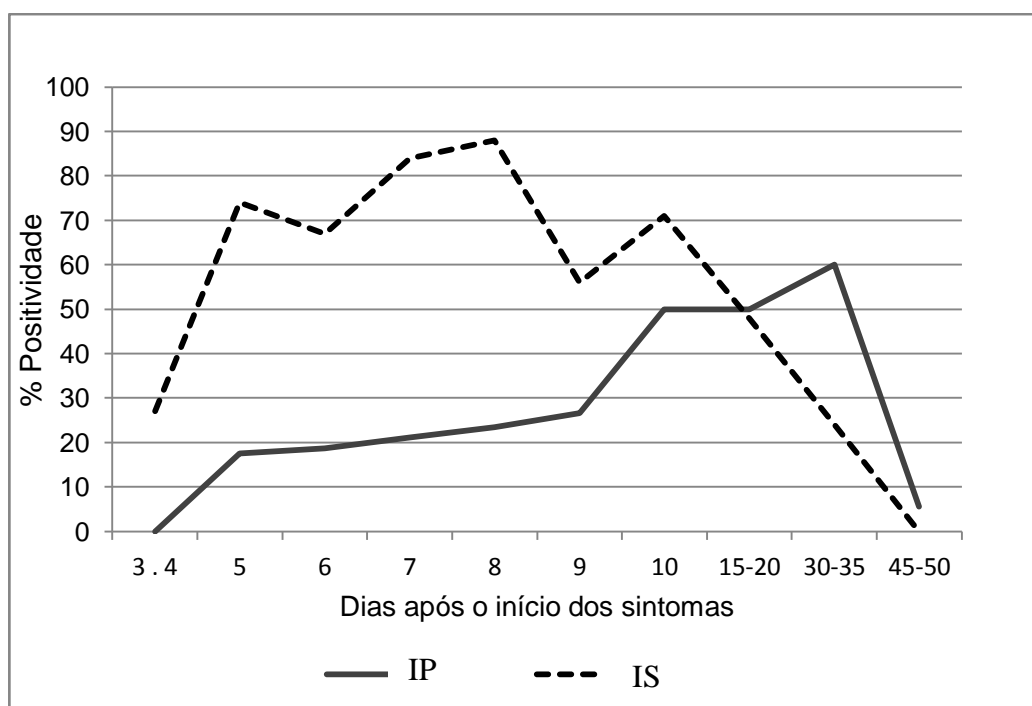


Fig. 1. Detecção da IgA anti-DENV em casos de infecção primária (IP) e infecção secundária (IS) de acordo com o número de dias após o início dos sintomas.

Observa-se que na infecção secundária os valores estimados para a sensibilidade e valor preditivo negativo do AAC-ELISA foram maiores do que na infecção primária (Tabela 2).

Tabela 2

Distribuição dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA na infecção primária e na secundária pelo DENV

Tipo de infecção	S (95% IC)	E (95% IC)	VPP (95% IC)	VPN (95% IC)
Infecção primária	27,5 (21,1-34,9)	100 (94,3-100)	100 (90,6-100)	39,2 (32,5-46,3)
Infecção secundária	55,2 (47,9-62,2)	100 (94,3-100)	100 (95,7-100)	47,9 (40,2-55,7)

S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; IC = intervalo de confiança.

Nas tabelas 3 e 4 estão demonstrados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo para todos os grupos analisados, distribuídos de acordo com dias de sintomas, na infecção primária e secundária, respectivamente.

Na infecção primária o AAC-ELISA apresentou uma maior sensibilidade (60,0%; 12/20) nas amostras coletadas com 30 a 35 dias de sintomas (grupo 9); enquanto nas amostras da infecção secundária a maior sensibilidade (87,5%; 14/16) foi observada no grupo 5, coletadas no oitavo dia de sintomas. Independentemente dos dias de sintomas, a especificidade do AAC-ELISA foi de 100% (94,3 – 100) nos dois tipos de infecção.

Tabela 3

Distribuição dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA na infecção primária em relação ao número de dias após o início dos sintomas

Grupos (Dias*)	S, % [N] (IC)	E, % (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)
1 (2-4)	- (0/17)	100 (94,3-100)	-	82,5 (73,1-89,5)
2 (5)	17,6 [3/17] (4,7-44,2)	100 (94,3-100)	100 (31-100)	85,1 (75,9-91,3)
3 (6)	18,7 [3/16] (5-46,3)	100 (94,3-100)	100 (31-100)	86,0 (76,9-92,1)
4 (7)	21,1 [4/19] (7-46,1)	100 (94,3-100)	100 (39,6-100)	84,2 (75,0-90,6)
5 (8)	23,5 [4/17] (7,8-50,2)	100 (94,3-100)	100 (39,6-100)	86,0 (76,9-92,1)
6 (9)	26,6 [4/15] (8,9-55,2)	100 (94,3-100)	100 (39,6-100)	87,9 (79,0-93,5)
7 (10)	50,0 [8/16] (25,5-74,5)	100 (94,3-100)	100 (59,8-100)	90,9 (82,4-95,7)
8 (15-20)	50,0 [8/16] (25,5-74,5)	100 (94,3-100)	100 (59,8-100)	90,9 (82,4-95,7)
9 (30-35)	60,0 [12/20] (36,4-80,0)	100 (94,3-100)	100 (69,9-100)	90,9 (82,4-95,7)
10 (40-45)	5,6 [1/18] (0,3-29,4)	100 (94,3-100)	100 (5,5-100)	82,5 (73,1-89,2)

*Dias após o início dos sintomas; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; N = número da amostra; IC = intervalo de confiança.

Observou-se um percentual de positividade para a IgA de 56% (14/25) para as amostras do grupo 11 (Tabela 4), coletadas entre 10 e 21 dias de sintomas, correspondente aos casos de infecção secundária pelo DENV, onde não houve detecção de IgM.

O AAC-ELISA apresentou especificidade de 100% nas amostras negativas para dengue (grupo 12) e nas amostras coletadas após a vacinação contra o vírus da febre amarela (grupo 13), demonstrando ausência de reação cruzada entre dengue e febre amarela.

Tabela 4

Distribuição dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA na infecção secundária em relação ao número de dias após o início dos sintomas

Grupos (Dias*)	S, % [N] (IC)	E, % (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)
1 (2-4)	26,7 [4/15] (8,9-55,2)	100 (94,3-100)	100 (39,6-100)	87,9 (79,0-93,5)
2 (5)	73,7 [14/19] (48,6-89,9)	100 (94,3-100)	100 (73,2-100)	94,1 (86,2-97,8)
3 (6)	66,7 [10/15] (38,7-87)	100 (94,3-100)	100 (65,5-100)	94,1 (86,2-97,8)
4 (7)	84,2 [16/19] (59,5-95,8)	100 (94,3-100)	100 (75,9-100)	96,4 (89,1-99,1)
5 (8)	87,5 [14/16] (60,4-97,8)	100 (94,3-100)	100 (73,2-100)	97,6 (90,6-99,6)
6 (9)	56,3 [9/16] (30,6-79,2)	100 (94,3-100)	100 (62,9-100)	92,0 (83,6-96,4)
7 (10)	70,6 [12/17] (44,0-88,6)	100 (94,3-100)	100 (69,9-100)	94,1 (86,2-97,8)
8 (15-20)	47,6 [10/21] (26,4-69,7)	100 (94,3-100)	100 (65,5-100)	87,9 (79,0-93,5)
9 (30-35)	23,5 [4/17] (7,8-50,2)	100 (94,3-100)	100 (39,6-100)	86,0 (76,9-92,1)
10 (40-45)	0 [0/14]	100 (94,3-100)	-	85,1 (75,9-91,3)
11 (10-21)	56 [14/25] (35,3-75)	100 (94,3-100)	100 (73,2-100)	87,9 (79,0-93,5)

*Dias após o início dos sintomas; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; N = número da amostra; IC = intervalo de confiança.

Analisando os dois ensaios em conjunto, para a detecção da IgM e IgA, observou-se um aumento da sensibilidade do diagnóstico, de 84,4% para 91% (6,6%) para o total das amostras dos casos de dengue; na infecção primária passou de 90,1% para 92,8%; entretanto, na infecção secundária houve um aumento significativo (15,2), de 79,4% quando usamos apenas a IgM para 94,6% quando usamos os ensaios em paralelo.

4. Discussão

Na infecção pelo DENV a imunoglobulina A é sintetizada simultaneamente à IgM, podendo ser igualmente detectada no sangue (Balmaseda et al., 2003; Talarmin et al., 1998), consequentemente, a IgA também poderia ser empregada para fins de diagnóstico dessa infecção.

No presente estudo observou-se uma sensibilidade do ELISA para IgA de 42,2% (154/365), na IgM a positividade foi de 84,4% para as mesmas amostras. Em outros estudos foram encontrados percentuais de positividade da IgA semelhantes aos nossos: Talarmin et al. (1998) encontraram 47,75% (85/178) e Nawa et al. (2005) 24,47% (23/94), enquanto Hernández et al. (2012) utilizando o teste cromatográfico “Dengue IgA Rapid test” (ASSURE®) detectaram a IgA em 61% (105/172) das amostras testadas. Convém ressaltar que nesses estudos foi analisado um menor número de amostras, além do que, em nossa casuística, levou-se em conta a data da coleta da amostra em relação ao número de dias após o início dos sintomas, bem como o tipo de infecção dos casos: 46,8% (171 amostras) eram de casos de infecção primária e 53,2% de secundária (194 amostras).

A presença de IgA foi detectada em maior frequência nas amostras dos casos de infecção secundária (55,2%), em contraste com 27,5% da infecção primária, corroborando com os dados de Vázquez et al. (2005), que utilizando o AAC-ELISA detectaram a IgA em 17% dos casos na infecção primária e em 62% na secundária.

Em oposição a esses resultados, Ahmed et al. (2010), obtiveram uma sensibilidade de 100% na infecção primária e 99,2% na secundária, porém empregando um teste rápido. Geralmente são encontrados resultados falsos positivos em testes rápidos, o que em tese, poderia explicar os altos percentuais encontrados. Outros estudos também observaram valores de sensibilidade mais

elevados quando aplicaram o teste rápido (ASSURE® Dengue IgA Rapid Test) para detecção de IgA sérica (Hernández et al., 2012; Tan et al., 2011). No entanto, Hernández et al. (2012) identificaram 14,9% (7/47) de reações positivas em amostras de doadores de sangue negativos para dengue. Em nosso estudo, ao utilizarmos esse mesmo kit para selecionar amostras de soro IgA positivas, a sensibilidade encontrada foi de apenas 32,5% (13/40).

Diferenças na sensibilidade também podem ser explicadas pelo tipo de infecção analisada, diferentes metodologias empregadas para detecção de IgA anti-DENV e pela prevalência da infecção nas diferentes áreas geográficas. Nas regiões onde o DENV é endêmico ocorrem mais casos de infecção secundária.

Em concordância com os resultados obtidos por Talarmin et al. (1998), não se detectou a IgA em amostras coletadas após o 45º dia do início da infecção, apenas uma única amostra de infecção primária foi reagente. Para Nawa et al. (2005), a IgA permanece positiva por um menor período de tempo quando comparada com a IgM, o que representa uma vantagem no seu emprego como diagnóstico. A presença de IgM pode não indicar uma doença em curso, essa imunoglobulina pode permanecer no sangue por três meses ou mais, após a infecção (Chen, Hwang, Fang, 1991; Peeling et al., 2010).

Por outro lado, estudos têm demonstrado a ocorrência de sorologias negativas para IgM em casos de infecções secundárias pelo DENV, mesmo em amostras da fase convalescente (Guzmán e Kourí, 2004; Cordeiro et al, 2007). Esta pesquisa mostrou que o AAC-ELISA foi capaz de detectar a IgA em 56% (14/25) das amostras do grupo 11, cujo resultado de IgM foi negativo, tanto nas amostras de soro coletadas na fase aguda quanto na convalescença e que foram confirmados como dengue, clinicamente, por isolamento viral e por RT-PCR. Dessa forma, o

AAC-ELISA identificou a infecção em amostras que na prática clínica seriam consideradas inconclusivas. Também nas amostras de infecção secundária a IgA foi detectada antes da IgM, nas amostras coletadas 2 a 4 dias após o início dos sintomas. Geralmente a IgA aparece um dia após a IgM (Balmaseda et al., 2003; Talarmin et al., 1998).

Peeling et al. (2010) detectaram a IgM entre o 3º e o 5º dias após o início da febre em cerca de 50% dos pacientes hospitalizados, apresentando uma sensibilidade de 90% e especificidade de 98% quando os ensaios foram realizados em cinco dias ou mais após o início da febre. Contudo, vários estudos demonstraram que esses dados podem variar dependendo do tipo de infecção.

No estudo de Talarmin et al. (1998) o pico da IgA ocorreu no 8º dia após o início da febre, contudo o tipo de infecção não foi estabelecido para a maioria das amostras; para Balmaseda et al.; (2003) observou-se no 5º dia, já em nossa casuística, para o grupo das amostras de infecção secundária, o maior percentual de positividade também foi observado no 8º dia, diferentemente dos casos de infecção primária que ocorreu no grupo com 30-35 dias do início dos sintomas.

Com relação à especificidade, o AAC-ELISA se mostrou muito eficiente, a IgA não foi detectada nas amostras negativas para dengue e nem naquelas com IgM positiva para o vírus febre amarela vacinal, indicando ausência de reação cruzada.

A fim de estimar o aumento na sensibilidade do diagnóstico avaliou-se a aplicação em paralelo dos ensaios em conjunto para a detecção da IgM e IgA, observando-se um aumento de 6,6% da sensibilidade, em relação à pesquisa da IgM isoladamente, e nas infecções primária e secundária de 2,7% e 15,2%, respectivamente. Ressaltando-se a importância de utilizar a pesquisa da IgM e IgA em paralelo (Balmaseda et al., 2003; Nawa et al., 2005; Vázquez et al., 2007).

Apesar de apresentar-se menos sensível que a detecção da IgM, o AAC-ELISA demonstrou ser uma importante ferramenta diagnóstica na infecção secundária, onde há maior probabilidade da IgM não ser detectada. Além disso, o AAC-ELISA mostrou-se específico frente às amostras negativas para dengue e após a vacinação contra febre amarela. A detecção em paralelo de IgM e IgA em casos suspeitos de dengue aumentaria, significativamente, a sensibilidade do diagnóstico sorológico.

Referências

- Ahmed, F et al. (2010) Evaluation of ASSURE[®] Dengue IgA Rapid Test using dengue-positive and dengue-negative samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 68:339–344.
- Balmaseda, A et al. (2003) Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgA Antibodies in Serum and Saliva. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:317-322.
- Chen WJ, Hwang KP, Fang AH (1991) Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 22:659–63.
- Cordeiro MT et al. (2007) Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 1128–1134.
- Guzmán MG, Kouri G (1996) Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3:621–627.
- Guzmán MG, Kourí G (2004) Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases* 8:69-80.

- Guzmán, M.G. et al. (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 7-16.
- Halstead SB (2007) Dengue. *Lancet* 370:1644 – 1652.
- Henchal EA et al. (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31: 830-6.
- Hernández SIC et al. (2012) Evaluation of a novel commercial rapid test for dengue diagnosis based on specific IgA detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 72:150–155.
- Igarashi, A. (1978) Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *The Journal of General Virology* 40: 531-544.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ (1987) Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36:153-159.
- Lanciotti RS et al. (1992) Rapid Detection and Typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase Polymerase chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 545-551.
- Melo AB et al. (2011) Description of a Prospective 17DD Yellow Fever Vaccine Cohort in Recife, Brazil. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85:739–747.
- Nawa M et al. (2005) Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Serodiagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:1235–1237.
- Oliveira MJC et al. (2008) Frequência de sarampo, rubéola, dengue e eritema infeccioso entre casos suspeitos de sarampo e rubéola no estado de

- Pernambuco, no período de 2001 a 2004. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41:338-344.
- Peeling et al. (2010) Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature reviews microbiology* s30-s38.
- Talarmin A et al. (1998) Immunoglobulin A-Specific Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Fever. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1189–1192.
- Tan YY et al. (2011) Development of ASSURE® Dengue IgA Rapid Test for the Detection of Anti-dengue IgA from Dengue Infected Patients. *Journal of Global Infectious Diseases* 3: 233-240.
- Vázquez S et al. (2007) Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *International Journal of Infectious Diseases* 11:256-262.
- Vázquez S et al. (2005) Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *Journal of Clinical Virology* 33: 132–137.

6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- Foi detectada uma maior frequência de IgA na infecção secundária, assim como a sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo do AAC-ELISA;
- Houve uma maior sensibilidade para detecção da IgA na infecção primária entre o 30º e 35º dias após o início dos sintomas e na infecção secundária no 8º dia, indicando que a infecção pode ter ocorrido neste período.
- A especificidade e o valor preditivo positivo foram similares em ambos os tipos de infecções conforme os dias se sintomas;
- O AAC-ELISA apresentou boa especificidade frente às amostras negativas para dengue e após a vacinação contra o vírus da febre amarela;
- A IgA foi detectada entre o 2º e 4º dias de sintomas, enquanto que a IgM estava presente somente após o 5º dia após o início dos sintomas;
- Após a aplicação em paralelo para detecção da IgM e IgA, foi observado um maior ganho de sensibilidade na infecção secundária.

7 CONSIDERAÇÕES

FINAIS

Apesar de apresentar-se menos sensível que a detecção da IgM, o AAC-ELISA demonstrou ser importante na infecção secundária, principalmente nos casos onde a IgM não foi detectada. A aplicação do teste em paralelo aumentou a sensibilidade do diagnóstico sorológico, além disso, o AAC-ELISA mostrou-se específico frente às amostras negativas para dengue e após a vacinação contra o vírus da febre amarela.

O emprego dos dois ensaios pode fornecer informações úteis para a interpretação dos resultados e, conseqüentemente, para a detecção de casos recentes de dengue, auxiliando na adoção de medidas preventivas de modo a evitar a ocorrência dos casos graves.

REFERÊNCIAS

AHMED, F. et al. Evaluation of ASSURE® Dengue IgA Rapid Test using dengue-positive and dengue-negative samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 339–344, 2010.

BALMASEDA, A. et al. Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgA Antibodies in Serum and Saliva. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 317-322, 2003.

BARRETO M.L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, v.377, p. 1877–1889, 2011.

BLACKSELL, S.D. et al. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 43-49, 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_de_dengue_classica_brasil_1990_2011.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013a.

BRASIL. Ministério da saúde. Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia_de_dengue_brasil_1990_2011_21_06_12.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013b.

BRASIL. Ministério da saúde. Óbitos por Febre Hemorrágica da Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/obitos_por_dengue_1990_2011_21_06_12.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013c.

CHEN, W.J.; HWANG, K.P.; FANG, A.H. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 22, n. 4, p. 659–663, 1991.

CORDEIRO, M.T. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 605-611, 2007a.

CORDEIRO, M.T. et al. Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 1128–1134, 2007b.

DATTA, S; WATTAL, C. Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28, p. 107-110, 2010.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

GUZMÁN, M.G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, 10.1038/nrmicro2460, p. 7-16, 2010.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621–627, 1996.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 69-80, 2004.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 370, p. 1644 – 1652, 2007.

HENCHAL, E. A. et al. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, p. 830-6, 1982.

HERNÁNDEZ, S. I. C. Et al. Evaluation of a novel commercial rapid test for dengue diagnosis based on specific IgA detection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 150–155, 2012.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **The Journal of General Virology**, v. 40, p. 531-544, 1978.

KORAKA, P. et al. Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4332–4338, 2001.

KUNO, G.; GÓMEZ, I.; GUBLER, D.J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, p. 153-159, 1987.

LANCIOTTI, R.S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase Polymerase chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.3, p. 545-551, 1992.

LIMA, M.R.Q. et al. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-8, 2010.

MELO, A.B. et al. Description of a Prospective 17DD Yellow Fever Vaccine Cohort in Recife, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 739–747, 2011.

NAWA, M. et al. Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Serodiagnosis of Dengue Virus Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 10, p. 1235–1237, 2005.

NOGUEIRA, R. M. R.; EPPINGHAUS, A. L. F. et al. Dengue virus 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255-56, 2011.

OLIVEIRA, M.J.C. et al. Frequência de sarampo, rubéola, dengue e eritema infeccioso entre casos suspeitos de sarampo e rubéola no estado de Pernambuco, no período de 2001 a 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 338-344, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, New Edition, Geneva, 2009.

_____. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Publicación Científica n.548, Washington, D.C., 1995, 109 p.

PAULA, S.O.; FONSECA, B.A.L. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

PEELING et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature reviews microbiology**, p. s30-s38, 2010.

PENNA, G.O. et al. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 865-77, 2011.

ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 532-543, 2011.

SHU, P.Y.; HUANG, J.H. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 642–650, 2004.

TALARMIN, A. et al. Immunoglobulin A-Specific Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1189–1192, 1998.

TEIXEIRA, M.G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 07-18, 2009.

TEMPORÃO, J. G. et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 938-939, 2011.

TRICOU, V. et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses, **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 142, p. 1-8, 2010.

VÁZQUEZ, S. et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, p. 132–137, 2005.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 26, p. 7221– 7228, 2011.

YAP, G.; SIL, B.K.; NG, C.L. Use of Saliva for Early Dengue Diagnosis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 01-07, 2011.

Referências elaboradas de acordo com
as normas da ABNT (NBR 6023).

APÊNDICES

APÊNDICE A**VERSÃO DO ARTIGO EM INGLÊS****Application of enzyme immunoassay capture of immunoglobulin A (IgA) in the serological diagnosis of dengue**

Viviane Martha Santos de Moraes^{a,b}, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{b,c}, Ana Isabel Vieira Fernandes^d, Jéfferson Luis de Almeida Silva^{a,b}, Verônica Gomes da Silva^e, Marli Tenório Cordeiro^e

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil; ^bSetor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil; ^cDepartamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; ^dDepartamento de Promoção da Saúde do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba; ^eLaboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FioCruz, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil

Abstract

Anti-dengue IgA was investigated by capture ELISA (AAcELISA) in sera of 365 dengue cases, being 171 primary (PI) and 194 secondary infections (SI), distributed according to days of symptoms. The overall sensitivity was 42.2% (154/365) with higher positivity in SI compared to PI (55.2% vs. 27.5%, $p = 0.000$); and 100% specificity. In SI IgA was detected before IgM, 2-4 days after symptoms onset and in 10-21 days samples (without IgM). In PI, the highest sensitivity was 60.0% in samples 30-35 days and in SI was 87.5% in 8 days samples. In SI cases without IgM (group 11) IgA was detected in 56.0% of cases. Detection of IgM and IgA in parallel

increased the sensitivity, especially in SI (79.4% to 94.6%). IgA ELISA used in parallel with IgM ELISA increased the sensitivity of the diagnosis from 84.4% (IgM) to 91% (IgM and IgA), and would help in serological dengue diagnosis.

1. Introduction

Dengue is an acute viral disease caused by one of four serotypes of dengue virus (DENV), which may manifest with a broad spectrum of signs and symptoms similar to other acute febrile conditions (Oliveira et al., 2008).

Dengue can be observed in two patterns of immune response: the primary infection that occurs in individuals who are not immune to any of the four serotypes of the virus and secondary infection when the subject was re-infected with a different serotype of DENV infection Previous (Halstead, 2007).

According to Halstead (2007), during primary infection viremia coincides with the foot, characterized by a slow response with low antibody titers. The first arises immunoglobulin is IgM, while IgG appears in low titers after the first week of the disease, and increases slowly. Already in secondary infections are detected high levels of IgG, even in the acute phase and increase in two consecutive weeks.

In the acute phase of dengue infection can be diagnosed by detection of viral RNA by polymerase chain reaction associated reverse transcriptase (RT-PCR), by isolating the virus, or by detection of antigen NS1. However, the enzyme immunoassay for IgM antibody capture (MAC-ELISA) is the most commonly used and allows for the presumptive diagnosis of active or recent infection. Uses a single sample of patient serum and can be used until 70 to 90 days after the onset of symptoms (Guzman et al. 2010; Kuno, Gómez, Gubler, 1987).

The diagnosis of dengue performed only by the detection of immunoglobulin M (IgM) has limitations when used in endemic regions, where there is a high prevalence and movement of various serotypes, and not always the detection of IgM indicates an acute and recent infection. Moreover, the results of this technique must be interpreted cautiously because IgM may reflect an infection occurred up to eight months (Chen, Hwang, Fang, 1991) and in some cases secondary infection (sequential), production IgM is found at low levels and sometimes undetectable (Balmaseda et al. 2003; Guzman, Kouri, 1996).

In dengue infection immunoglobulin A (IgA) is produced simultaneously with IgM and can also be detected in the blood, could therefore be employed for diagnostic purposes. According to some studies, detection of IgA anti-dengue IgM may occur before and decreases faster than IgM was not found after 40 days of onset of symptoms (Balmaseda et al. 2003; Talarmin et al. 1998).

Therefore, this study aimed to estimate the sensitivity and specificity of AAC-ELISA for the detection of IgA anti-DENV, and assess whether this immunoglobulin is a good marker to aid in the laboratory diagnosis of the disease.

2. Materials and Methods

2.1. Study population and sample size

Were included in this study 445 serum samples bank of biological samples at the Department of Virology and Experimental Therapy (LaViTE), Research Center Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife-PE, Brazil. We evaluated 365 samples from patients with clinical suspicion of dengue enrolled in public and private hospitals in the city of Recife confirmed as dengue, as described by Lamb et al. (2007),

distributed into 11 groups according to the number of days of symptoms as shown in Table 1.

Table 1

Serum samples used in this study distributed in groups according to the number of days after the onset of fever and status of infection

Groups	Days after symptoms onset	Presence of IgM	*Type of Infection		
			PI (N=171)	SI (N=194)	Total (N=365)
1 [#]	2-4	No	17	15	32
2	5	Yes	17	19	36
3	6	Yes	16	15	31
4	7	Yes	19	19	38
5	8	Yes	17	16	33
6	9	Yes	15	16	31
7	10	Yes	16	17	33
8	15-20	Yes	16	21	37
9	30-35	Yes	20	17	37
10	45-50	Yes	18	14	32
11 [#]	10 - 21	No	-	25	25

*Type of dengue infection is indicated as all types (Total), primary infection (PI), secondary infection (SI); (N=) number of sera tested; [#]Samples from dengue cases with IgM negative, but with virus isolation and/or RT-PCR positive.

Additionally, we included two groups of negative controls for comparison: group 12, composed of samples from 40 healthy individuals were negative for dengue and the group composed of 13 samples collected from the same individuals after vaccination against yellow fever IgM positive for this virus for the purpose of evaluating the occurrence of cross-reactivity. Serum samples were stored at -20 ° C

in small aliquots.

2.2. Characterization of samples of cases of dengue

Briefly, the diagnostic laboratory for confirmation and characterization of dengue cases was performed as described below:

For the isolation of the virus was used cell line mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (Igarashi, 1978), using the L15 Leibovitz medium (GIBCO, Invitrogen Co., Grand Island, New York) with 5% fetal bovine serum in the growth medium and 2% for maintenance medium. The virus isolates were identified by indirect immunofluorescence (Henchal et al., 1982), using monoclonal antibodies to the four serotypes of DENV (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

The molecular diagnosis was made by polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT-PCR). The extraction of viral RNA from serum was performed using the QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). For the detection and identification of viral RNA virus was used protocol described by Lanciotti et al. (1992). In this technique, primers are used (primers) universal dengue virus genes located in the C and prM and serotype is identified by using serotype-specific primers in a semi-nested PCR in a second amplification.

For detection of IgM and IgG anti-dengue ELISA kits were used PanBio of capture, anti-dengue IgM and IgG anti-dengue ELISA (PanBio, Pty. Ltd., Brisbane, Australia) and tests performed and interpreted as recommended by the manufacturer.

The characterization of the patient's immune response to infection with dengue virus in primary and secondary been made based on the kinetics of antibody IgM and IgG, according to the following criteria: A) Primary Infection was defined as the absence of antibodies IgG anti-dengue in the serum sample collected during the

acute phase of disease, while IgM was present, and / or virus isolation and / or RT-PCR positive. In the second sample collected in the convalescent phase, IgG antibodies to dengue were detected, being observed serologic conversion. B) Secondary Infection was defined by the detection of IgG anti-dengue antibodies in the serum sample collected during the acute phase of the disease and the absence of anti-dengue IgM associated (or not) with virus isolation and / or RT-PCR positive, some cases. In serum sample collected during convalescent specific IgM antibodies were detected (Lamb et al, 2007b).

2.3. Characterization of the negative controls

Serum samples used as negative controls were obtained from healthy individuals before receiving the yellow fever vaccine (n = 40), with a new collection of the same individuals 30 to 60 days after vaccination (n = 40; with IgM and IgG positive for yellow fever). These were subjected to tests for detection of anti-dengue IgM, IgG and IgM ELISA for yellow fever virus and the neutralization test plaque reduction to yellow fever, as described in Melo et al. (2011). Besides these samples was used as a negative control test in all experiments, a pool of sera negative for dengue, yellow fever, rubella, measles and parvovirus.

2.4. Characterization of the positive control

To obtain samples of serum IgA positive for dengue, used as positive control in the assays, were screened 40 serum samples positive for dengue IgM by the rapid immunochromatographic test ASSURE ® Dengue IgA Rapid Test (MP Diagnostics), of which 13 samples were positive pool was made a six sera and stored at -20 ° C in small aliquots.

2.5. Enzyme immunoassay for detection of IgA

The capture enzyme immunoassay for IgA in house (AAC-ELISA) used in the study was based on the protocol of the MAC-ELISA developed by Kuno, Gómez, Gubler (1987), with some modifications.

Sensitization of the microplate - In the first step of the assay polystyrene microplates with 96 wells were washed with a solution buffered saline (PBS) with 0.05% Tween. Then 100µL were sensitized with anti-human IgA (SIGMA) diluted in carbonate buffer pH 9.0, containing 2µg/poço and incubated for 24 hours at 4 ° C in a moist chamber. The next day was carried out five washes with PBS/0,05% Tween.

Blocking of nonspecific sites - the second stage in blocking nonspecific sites with the addition of 200 µL of PBS solution containing 4% bovine albumin fraction V (BSA) - (INLAB) in microplates and incubation at room temperature in a moist chamber for 30 minutes, then washed four times with PBS/0,05% Tween.

Addition of samples - Samples of serum, positive and negative control were diluted 1:10 in PBS pH 7.4 with 1% BSA (assay diluent) and 50 l µ these samples were dispensed in microplate wells in duplicate. Two holes were intended for white containing 50µL of diluent, then the plate was incubated for 1 h at 37 ° C in a humid chamber, with subsequent washing.

Addition of antigens - antigens were used for each serotype of DENV produced in mouse brain (extracted by acetone), the Service Arbovirology the Evandro Chagas

Institute (Ministry of Health), Bethlehem (PA), kindly provided by Dr. Pedro Vasconcelos . The antigens were previously titrated individually to determine the optimal dilution thereof. Reaction was used in a pool of four antigens diluted (1/30) in PBS/1% BSA and dispensed 50 μ L per well, incubation for 1 h at 37 ° C in a moist chamber, followed by five washes.

Addition of secondary antibody - 25 μ l were dispensed (per well) of anti-flavivirus secondary antibody (MAB 6B6C-1), conjugated to peroxidase (CDC, USA), previously titrated, 1/13.000 diluted in PBS / 1% BSA , followed by incubation for 1 h at 37 ° C and five washings after this time.

Addition of substrate - microplate were added to 100 μ L of the substrate tetramethylbenzidine (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences) and incubated for 30 minutes at room temperature, protected from light. After this time the reaction was stopped by adding 100 μ L/well of a solution of H₂SO₄ 12.5%. The reading of the optical density (OD) of samples was performed on a spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) using 450 nm filter.

Interpretation of results - For the interpretation of the results we calculated an index value based on the following calculation: mean absorbance of test serum / mean absorbance of the negative control. Were considered positive (reactive) samples showed that the value of the index greater than two and negative (non-reactive) those with index value equal to or less than two. The samples with indeterminate results were repeated.

2.6. Statistical Analysis

The results of the readings obtained at the AAC-ELISA were stored in an Excel spreadsheet. Statistical analysis was performed using Epi-Info 6.04d. We applied the chi-square test, assuming a $p < 0.05$ to evaluate the significance of the detection of IgA in primary and secondary infection. Additionally was applied the detection of IgM and IgA in parallel to estimate the sensitivity of both tests.

3. Results

The sample of 365 confirmed cases of dengue (by virus isolation, RT-PCR and/or detection of IgM/IgG), included in this study had a positive overall IgA 42.2% (154/365) with increased frequency in infection secondary compared to primary infection (55.2% (107/194) vs. 27.5% (47/171), $p = 0.000$). In addition, the AAC-ELISA was 2 times (55.2/27.5) more sensitive for secondary infection when compared to the primary. The positivity for IgM was 84.38% (308/365).

Figure 1 shows the distribution of IgA-positive cases according days of symptoms, primary and secondary infection. The highest percentage of positive IgA in primary infection occurred between the 30th and 35th days of symptoms, while in secondary infection occurred on the 8th day of symptoms. From the 45th day of symptoms (group 10) IgA was no longer detected, only one sample was positive (1/18) in the primary infection.

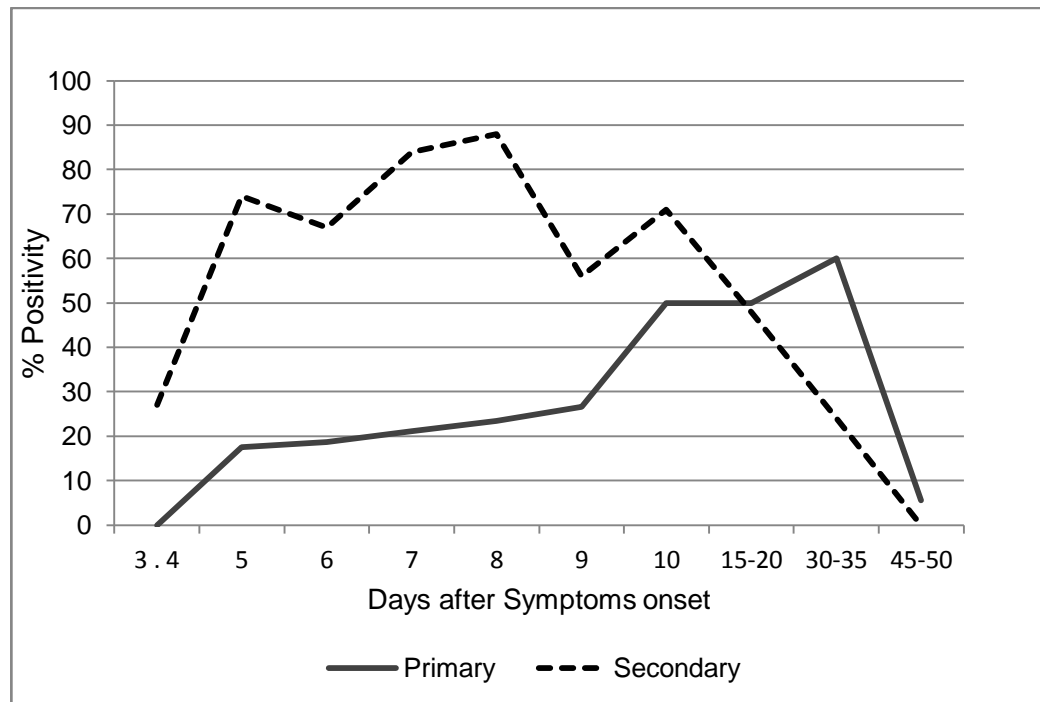


Fig. 1. Detection of DENV IgA antibodies in primary and secondary dengue infections cases according to the number of days after the onset of symptoms.

It is observed that the secondary infection estimated values for sensitivity and negative predictive value of AAC-ELISA were higher than in the primary infection (Table 2).

Table 2

Distribution of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of AAC-ELISA in primary and secondary infection by DENV

Type of infection	S (95% CI)	E (95% CI)	PPV (95% CI)	PNV (95% CI)
Primary Infection	27.5 (21.1-34.9)	100 (94.3-100)	100 (90.6-100)	39.2 (32.5-46.3)
Secondary Infection	55.2 (47.9-62.2)	100 (94.3-100)	100 (95.7-100)	47.9 (40.2-55.7)

S = sensitivity, specificity = E; PPV = positive predictive value, NPV = negative predictive value, CI = confidence interval.

Tables 3 and 4 are shown the values of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative for all groups, distributed according to days of symptoms in primary and secondary infection, respectively.

In primary infection AAC-ELISA showed higher sensitivity (60.0%, 12/20) in samples collected at 30 to 35 days of symptoms (group 9), while the samples of infection secondary to higher sensitivity (87.5% , 14/16) was observed in group 5, collected on the eighth day of symptoms. Regardless of days of symptoms, the specificity of AAC-ELISA was 100% (94.3 - 100) in both types of infection.

Table 3

Distribution of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of AAC-ELISA in primary infection cases in relation to the number of days since symptoms onset

Groups (Days [*])	Sensitivity, % [N] (CI)	Specificity, % (CI)	PPV (CI)	NPV (CI)
1 (2-4)	- (0/17)	100 (94.3-100)	-	82.5 (73.1-89.5)
2 (5)	17.6 [3/17] (4.7-44.2)	100 (94.3-100)	100 (31-100)	85.1 (75.9-91.3)
3 (6)	18.7 [3/16] (5-46.3)	100 (94.3-100)	100 (31-100)	86.0 (76.9-92.1)
4 (7)	21.1 [4/19] (7-46.1)	100 (94.3-100)	100 (39.6-100)	84.2 (75.0-90.6)
5 (8)	23.5 [4/17] (7.8-50.2)	100 (94.3-100)	100 (39.6-100)	86.0 (76.9-92.1)
6 (9)	26.6 [4/15] (8.9-55.2)	100 (94.3-100)	100 (39.6-100)	87.9 (79.0-93.5)
7 (10)	50.0 [8/16] (25.5-74.5)	100 (94.3-100)	100 (59.8-100)	90.9 (82.4-95.7)
8 (15-20)	50.0 [8/16] (25.5-74.5)	100 (94.3-100)	100 (59.8-100)	90.9 (82.4-95.7)
9 (30-35)	60.0 [12/20] (36.4-80.0)	100 (94.3-100)	100 (69.9-100)	90.9 (82.4-95.7)
10 (40-45)	5.6 [1/18] (0.3-29.4)	100 (94.3-100)	100 (5.5-100)	82.5 (73.1-89.2)

*Days refer to the day since symptoms onset; [N] = number of positive samples/total samples tested; (CI) = 95% confidence interval; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.

We observed a percentage of positive IgA 56% (14/25) for the samples of group 11 (Table 4) were collected between 10 and 21 days of symptoms corresponding to cases of secondary infection by DENV, where no IgM detection. The AAC-ELISA had a specificity of 100% in samples negative for dengue (group 12) and the samples collected after vaccination against yellow fever virus (group 13), demonstrating the absence of cross-reactivity between dengue and yellow fever.

Table 4

Distribution of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative secondary infection cases in relation to the number of days since symptoms onset

Groups (Days [*])	Sensitivity, % [N] (CI)	Specificity, % (CI)	PPV (CI)	NPV (CI)
1 (2-4)	26.7 [4/15] (8.9-55.2)	100 (94.3-100)	100 (39.6-100)	87.9 (79.0-93.5)
2 (5)	73.7 [14/19] (48.6-89.9)	100 (94.3-100)	100 (73.2-100)	94.1 (86.2-97.8)
3 (6)	66.7 [10/15] (38.7-87)	100 (94.3-100)	100 (65.5-100)	94.1 (86.2-97.8)
4 (7)	84.2 [16/19] (59.5-95.8)	100 (94.3-100)	100 (75.9-100)	96.4 (89.1-99.1)
5 (8)	87.5 [14/16] (60.4-97.8)	100 (94.3-100)	100 (73.2-100)	97.6 (90.6-99.6)
6 (9)	56.3 [9/16] (30.6-79.2)	100 (94.3-100)	100 (62.9-100)	92.0 (83.6-96.4)
7 (10)	70.6 [12/17] (44.0-88.6)	100 (94.3-100)	100 (69.9-100)	94.1 (86.2-97.8)
8 (15-20)	47.6 [10/21] (26.4-69.7)	100 (94.3-100)	100 (65.5-100)	87.9 (79.0-93.5)
9 (30-35)	23.5 [4/17] (7.8-50.2)	100 (94.3-100)	100 (39.6-100)	86.0 (76.9-92.1)
10 (40-45)	0 [0/14]	100 (94.3-100)	-	85.1 (75.9-91.3)
11 (10-21)	56 [14/25] (35.3-75)	100 (94.3-100)	100 (73.2-100)	87.9 (79.0-93.5)

*Days refer to the day since symptoms onset; [N] = number of positive samples/total samples tested; (CI) = 95% confidence interval; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.

Analyzing the two tests together for detection of IgM and IgA, we observed an increase in diagnostic sensitivity from 84.4% to 91% (6.6%) to the total sample of cases of dengue; primary infection increased from 90.1% to 92.8%, although in secondary infection there was a significant increase (15.2%), 79.4% when using only IgM to 94.6% when we use the testing in parallel.

4. Discussion

DENV infection in immunoglobulin A IgM is synthesized simultaneously with, and may also be detected in the blood (Balmaseda et al. 2003; Talarmin et al. 1998) thus IgA could also be used for diagnostic purposes such infection.

In the present study we observed a sensitivity of ELISA for IgA 42.2% (154/365) in IgM positivity was 84.4% for the same samples. In other studies found the percentage of positive IgA similar to ours: Talarmin et al. (1998) found 47.75% (85/178) and Nawa et al. (2005) 24.47% (23/94), while Hernandez et al. (2012) using the chromatographic test "Dengue IgA Rapid test" (ASSURE ®) IgA detected in 61% (105/172) of specimens tested. It is worth noting that these studies was analyzed a smaller number of samples, in addition to that in our study, we took into account the date of sample collection in relation to the number of days after onset of symptoms as well as the type of infection cases: 46.8% (171 samples) were cases of primary infection and 53.2% of secondary (194 samples).

The presence of IgA was detected in samples more frequently in cases of secondary infection (55.2%), in contrast to 27.5% of primary infection, corroborating data Vázquez et al. (2005), that using the AAC-ELISA IgA detected in 17% of cases the primary infection and 62% in secondary.

In contrast to these results, Ahmed et al. (2010) obtained a sensitivity of 100% in primary infection and 99.2% in secondary, but using a rapid test. They are usually found in false positive rapid tests, which in theory could explain the high percentage found. Other studies have also observed higher sensitivity when applied the rapid test (ASSURE ® Dengue IgA Rapid Test) for detection of serum IgA (Hernández et al., 2012; Tan et al., 2011). However, Hernandez et al. (2012) identified 14.9% (7/47) of positive reactions in samples of blood donors negative for dengue. In our study,

we used this same kit to select samples of serum IgA positive, the sensitivity was only 32.5% (13/40).

Differences in sensitivity can also be explained by the type of infection analyzed, different methodologies used for detection of IgA anti-DENV and the prevalence of infection in different geographical areas. In areas where DENV is endemic occur most cases of secondary infection.

In agreement with the results obtained by Talarmin et al. (1998), IgA was not detected in samples collected after the 45th day from the beginning of infection, only a single sample of primary infection was positive. For Nawa et al. (2005), IgA remains positive for a shorter time when compared with the IgM, which represents an advantage in their use as diagnostics. The presence of IgM may not indicate a disease in progress, this immunoglobulin may remain in the blood for three months or more after infection (Chen, Hwang, Fang, 1991; Peeling et al., 2010).

Furthermore, studies have demonstrated the occurrence of negative for IgM serology in cases of secondary infection by DENV, even in convalescent phase samples (Guzman and Kouri, 2004, Lamb et al, 2007). This study showed that the AAC-ELISA was able to detect IgA in 56% (14/25) samples of group 11, whose result IgM was negative in both the serum samples collected during acute and convalescent and were confirmed as dengue clinically by virus isolation and RT-PCR. Thus, the AAC-ELISA identified infection in samples which in clinical practice would be considered inconclusive. Also in samples of secondary infection IgA IgM was detected before, in samples collected 2-4 days after the onset of symptoms. Generally IgA appears one day after IgM (Balmaseda et al. 2003; Talarmin et al. 1998).

Peeling et al. (2010) detected IgM between the 3rd and 5th days after the onset of fever in approximately 50% of hospitalized patients with a sensitivity of 90% and specificity of 98% when the tests were performed in five days or more after initiation fever. However, several studies have shown that these data may vary depending on the type of infection.

In the study of Talarmin et al. (1998) peak of IgA occurred on the 8th day after the onset of fever, however the type of infection has not been established for most of the samples for Balmaseda et al.; (2003) was observed on day 5, as in our series, for the group of samples from secondary infection, the highest percentage of positivity was also observed on the 8th day, unlike the cases of primary infection that occurred in the group with 30-35 days of onset of symptoms.

Regarding specificity, the AAC-ELISA proved to be very efficient, IgA was not detected in samples negative for dengue, nor those with IgM positive for yellow fever virus vaccine, indicating no cross-reaction.

In order to estimate the increase in diagnostic sensitivity was assessed parallel implementation of testing kit for the detection of IgM and IgA, observing a 6.68% increase in sensitivity compared to the research of IgM alone and in primary and secondary infections of 2.7% and 15.2%, respectively. Underscoring the importance of using research IgM and IgA in parallel (Balmaseda et al., 2003; Nawa et al., 2005; Vázquez et al., 2007).

Despite presenting themselves less sensitive than detection of IgM, the AAC-ELISA is an important diagnostic tool in secondary infection, where there is a higher probability of not being detected IgM. Moreover, the AAC-ELISA was shown to be specific face of negative samples after dengue and yellow fever vaccination. The

parallel detection of IgM and IgA in suspected dengue cases increase significantly the sensitivity of serological diagnosis.

References

- Ahmed, F et al. (2010) Evaluation of ASSURE[®] Dengue IgA Rapid Test using dengue-positive and dengue-negative samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 68:339–344.
- Balmaseda, A et al. (2003) Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgA Antibodies in Serum and Saliva. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10:317-322.
- Chen WJ, Hwang KP, Fang AH (1991) Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 22:659–63.
- Cordeiro MT et al. (2007) Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 1128–1134.
- Cordeiro MT et al. (2009) Reliable Classifier to Differentiate Primary and Secondary Acute Dengue Infection Based on IgG ELISA. *Plos one* 4 :4945.
- Fletcher, R.H., Fletcher, S.W. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. 4th ed. Porto Alegre: artmed, 2006.
- Guzmán MG, Kouri G (1996) Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3:621–627.
- Guzmán MG, Kourí G (2004) Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases* 8:69-80.
- Halstead SB (2007) Dengue. *Lancet* 370:1644 – 1652.

- Henchal EA et al. (1982) Dengue virus-especific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31: 830-6.
- Hernández SIC et al. (2012) Evaluation of a novel commercial rapid test for dengue diagnosis based on specific IgA detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 72:150–155.
- Igarashi, A. (1978) Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *The Journal of General Virology* 40: 531-544.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ (1987) Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36:153-159.
- Lanciotti RS et al. (1992) Rapid Detection and Typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase Polymerase chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 545-551.
- Medronho, R.A., Bloch, K.V., Luiz R.R., Werneck, G.L. Epidemiologia. 2nd ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- Melo AB et al. (2011) Description of a Prospective 17DD Yellow Fever Vaccine Cohort in Recife, Brazil. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85:739–747.
- Nawa M et al. (2005) Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Serodiagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:1235–1237.
- Oliveira MJC et al. (2008) Frequência de sarampo, rubéola, dengue e eritema infeccioso entre casos suspeitos de sarampo e rubéola no estado de Pernambuco, no período de 2001 a 2004. *Revista da Sociedade Brasileira de*

Medicina Tropical 41:338-344.

Peeling et al. (2010) Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature reviews microbiology* s30-s38.

Talarmin A et al. (1998) Immunoglobulin A-Specific Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Fever. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1189–1192.

Tan YY et al. (2011) Development of ASSURE® Dengue IgA Rapid Test for the Detection of Anti-dengue IgA from Dengue Infected Patients. *Journal of Global Infectious Diseases* 3: 233-240.

Vázquez S et al. (2007) Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *International Journal of Infectious Diseases* 11:256-262.

Vázquez S et al. (2005) Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *Journal of Clinical Virology* 33: 132–137.

ANEXOS

ANEXO A
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE.
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 082/2012 - CEP/CCS

Recife, 01 de fevereiro de 2012

A

Mestranda Viviane Martha Santos de Moraes

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - CCS/UFPE

Registro do SISNEP FR - 483687

CAAE – 0503.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 510/11

Título: Avaliação do emprego da IgA como marcador sorológico na confirmação de casos agudos de dengue.

Senhor (a) Pesquisador (a):

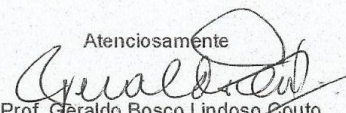
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 01 de fevereiro 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

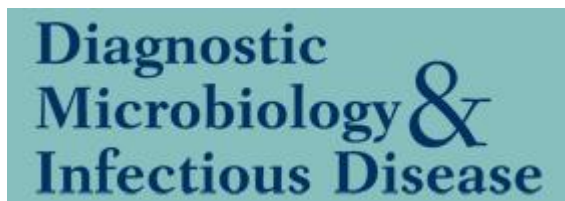
Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE


ANEXO B

Normas para Publicação da revista



Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Instructions to Authors

As of 01 June 2005, all new manuscripts must be submitted through the *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* online submission and review Web site ( <http://ees.elsevier.com/dmid/>). Authors are requested to submit the text, tables, and artwork in electronic form (not as a PDF) to this address. In an accompanying letter, authors should state that the manuscript, or parts of it, have not been and will not be submitted elsewhere for publication. Authors are highly encouraged to include a list of three or more potential reviewers for their manuscript, with complete contact information.

Submission items include a cover letter (save as a separate file for upload), suggested reviewers, the manuscript (including title page, abstract, manuscript text, references, and table/figure legends), tables, and figures. Revised manuscripts should also be accompanied by a unique file (separate from the covering letter) with responses to reviewers' comments. The preferred order of files is as follows: cover letter, suggested reviewers, response to reviews (revised manuscripts only), manuscript file(s), table(s), figure(s). Files should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Tables3.doc). Upload text, tables and graphics as separate files. (You can compress multiple figure files into a Zip file and upload that in one step; the system will then unpack the files and prompt you to name each figure.) Do not import figures or tables into the text document and do not upload your text as a PDF. Complete instructions for electronic artwork submission can be found on the Author Gateway, accessible through the journal home page. Your figures will be tested by an artwork quality check tool; you will be

asked to view the results before you can complete your submission. Your figures can move into review if not up to production standards, but you should be prepared to provide better quality figures should we express interest in your manuscript.

Authors who are unable to provide an electronic version or have other circumstances that prevent online submission must contact the Editors prior to submission to discuss alternate options. The Publisher and Editors regret that they are not able to consider submissions that do not follow these procedures.

Please note, although the Elsevier Editorial System Registration page asks if you are available for reviews, we are not currently seeking new reviewers as members of the Editorial Board. All other correspondence should be addressed to the Editor in Chief: Ronald N. Jones, M.D., Editorial Office, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Suite A, 345 Beaver Creek Centre, North Liberty, Iowa 52317, USA.

Manuscripts

Papers may be submitted that are full-length articles (including subject review articles), or short notes. Manuscripts are accepted with the understanding that they are original, unpublished work and are not being submitted elsewhere. All manuscripts are subjected to peer review by the editors, by members of the Editorial Board, or by other qualified reviewers.

Papers must be accompanied by a letter signed by the corresponding author indicating that they have read and are familiar with the current "Instructions to Authors" (published in each issue) and will comply with the instructions and stated conditions. The letter should indicate that all of the named authors and acknowledged parties have agreed to the submitted draft of the paper or, as providers of personal communications, have consented to their inclusion, and that the content/submission is original/unpublished and has not been simultaneously submitted to another medical journal. Furthermore, previous or other publication of any or part of the content of the manuscript (including conference or congress proceedings, letters, and brief communications) must be declared on the title page. Failure to comply with the above mentioned policies may result in a 3-year

suspension of publishing privileges in this journal.

Manuscripts should be submitted via the [Elsevier Editorial System](#), in English, double-spaced, and, where appropriate, divided into *Introduction*; *Materials and Methods*, which should include sufficient technical information so that experiments can be repeated and which should give sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains; *Results*, which should describe the design of the experiments as well as the results using text, tables, or figures; and *Discussion*, which should provide an interpretation of the results in relation to previously published work. An *abstract* is required for all papers; it should be 150 words or less for full-length papers and 50 words or less for notes. Papers for the Notes category, which is intended for the presentation of brief observations (including instructive case reports), that do not warrant full-length papers, should not contain any section heading and should not exceed 1,000 words.

The first page of the manuscript should include: title, running title of not more than 45 characters and spaces, full names of all authors, address of the institution at which the work was performed, and the corresponding author's full address, telephone number, and FAX number. Any change of address by any of the authors should also be noted. Any footnotes to the text should be numbered using Arabic numerals and should be typed on the page of the manuscript on which they are referred to.

Tables

Tables should be on separate files and numbered using Arabic numerals. Each table should have a brief title with detailed information appearing as footnotes bearing superscript, lower-case letters. Vertical rules should be avoided.

References

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications should not be in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as 'in press' implies that the

item has been accepted for publication. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* uses the standard 'Vancouver' system with name and year in the text.

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated in wheat (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"


List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book: Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan, 1979.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc.; 1994. p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34), see also 

http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html

Figures

All manuscripts must be accompanied by complete artwork. Each figure must be on a separate file. Electron micrographs should be of sufficient contrast to withstand reduction and printing at the journal page size. The cost of printing color photographs must be borne by the author. Any graphs, charts, or diagrams should be finished drawings, using type size large enough to be read easily when reduced to page size.

Proofs and Reprints

The corresponding author will receive page proofs, which should be corrected and returned within 48 hours of receipt. Corrections are limited to printer's errors and no substantial author's changes will be made. Reprints may be ordered at the price listed on the order form accompanying the proofs.

Style and Nomenclature

Authors should use the *CBE* (Council of Biology Editors) *Style Manual*, 5th ed., as a general guide for style. The names of chemical compounds should conform with *Chemical Abstracts* and its indexes or *The Merck Index*, 11th ed. Enzymes and biochemical terms should bear the recommended, trivial name listed in the latest edition of *Enzyme Nomenclature*. Whenever possible, use generic drug names. Binary names consisting of a generic name and a species name must be used for all microorganisms. Names of general and higher categories may be used alone. However, a species name must be preceded by the complete generic name the first time that it is used in the manuscript. Following this, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (for example, *S. aureus*), provided there can be no confusion with other genera of organisms used in the paper. The nomenclature for bacteria should follow well-established references such as *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (current edition) or the *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., or validation lists and specific articles published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* since January 1, 1989. Informative web sites are available as well (☞ <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> and ☞

<http://www.bacterio.cict.fr>).

Nomenclature and classifications of fungi and yeasts are the responsibility of the manuscript authors as guided by published sources such as *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. (2001) and *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. (1998).

Names used for viruses should be those listed in the International Committee on Taxonomy of Viruses publication (*Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee of Taxonomy and Viruses*, 2000). Synonyms may be used in parentheses when the name is first used in conjunction with the approved generic (or group) and family names.

Copyright

Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer will insure the widest possible dissemination of information under the US copyright law. Unless this agreement is executed, the journal will not publish the manuscript.