

DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE), CAPTURADOS NA ZONA URBANA DE MANAUS, AMAZONAS, 2011

Antonio José Leão CARDOSO¹; Stefane Reis PEREIRA²; Cristóvão Alves da COSTA³
1 - Bolsista PAIC/FAPEAM; 2 - Bolsista PIBIC/CNPq; 3 - Orientador INPA/CSAS

1.Introdução

A dengue é a arbovirose mais importante no Brasil, em número de casos e em letalidade (Figueiredo *et al.*, 2010), tendo como vetores mosquitos *Aedes spp.*, e epidemias têm sido relatadas desde 1985 no país. A cidade de Manaus está sendo infestada por *Aedes aegypti* desde 1996, e o primeiro caso de febre de dengue aconteceu em 1998, causado pelos sorotipos DENV 1 e DENV 2 (Bastos, 2004). O sorotipo DENV 3 fora isolado pela primeira vez em 2002 e, em 2008 houve o primeiro caso de DENV 4 (Figueiredo *et al.*, 2008). Este estudo faz parte de um sistema de vigilância do vírus dengue e teve como objetivo realizar a detecção do vírus e seus sorotipos direto dos vetores.

2.Material e Métodos

Os mosquitos foram coletados entre os anos de Janeiro de 2011 e Junho de 2012. Sua captura ocorreu ao longo das zonas geográficas do município de Manaus, e as capturas foram realizadas na área peridomiciliar e dentro das residências, durante o período diurno, com prévia aprovação dos moradores. Os mosquitos coletados foram anestesiados com clorofórmio e transferidos para tubos parafinados e alocados em caixas de gelo para o transporte até o laboratório de Virologia Tropical do INPA, os espécimes foram identificados e agrupados em quantias de até 10 mosquitos por microtubo (*pool*), de acordo com gênero, data de coleta, bairro e, então armazenados a -70°C. *Pools* de 1 a 10 exemplares de *Aedes aegypti* foram organizados num total de 28 *pools* e cinco *Aedes albopictus*, organizados em 4 *pools*. Cada *pool* foi macerado em uma solução tampão fosfato-salino (PBS). Os mosquitos macerados, tiveram o RNA extraído fazendo uso do método *Axy Prep Body Fluid Viral DNA / RNA Miniprep kit* (Axygen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Esses extraídos foram submetidos a três diferentes metodologias de detecção: uma RT-PCR (Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polimerase), para detecção do gênero *Flavivirus*, seguida de uma *Nested-PCR* para identificação de espécie de DENV, ambos baseados no tamanho dos *amplicons* (Lanciotti *et al.*, 1992), uma RT-PCR seguida de *Multiplex-Nested-PCR* (Bronzoni *et al.*, 2005) e uma RT-PCR em tempo-real (Dos Santos *et al.*, 2008) para detecção de DENV diretamente dos vetores. Todas as amostras com suspeita de positividade foram encaminhadas para isolamento e amplificação em cultura de células C636 e novamente processadas. E a visualização das amostras foi realizada em Eletroforese em Gel de Agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 2000)

3.Resultados e Discussão

Foram coletados 165 mosquitos da espécie *A. aegypti*, desses 12 *pools* (37,5%), sendo sete *pools* de fêmeas e cinco de machos; enquanto *A. albopictus* nenhum foi positivo (Tabela I).

Tabela I: Resultado das amostras processadas.

Espécie	Nº de <i>pools</i> processados	Nº total de mosquitos <i>pools</i>	de nos	Nº (%) de <i>pools</i> positivos	D1	D2	D3	D4
<i>Ae. aegypti</i>	28	165		12 (37,5%)	0	1	2	5
<i>Ae. albopictus</i>	4	5		0 (0%)	0	0	0	0
Total	32	170		12	0	1	2	5

As três metodologias confirmaram a positividade do vírus em diferentes *pools*, sendo DENV 2, DENV 3 e DENV 4, respectivamente. O sorotipo DENV 2 foi detectado em um *pool*, o sorotipo DENV 3, em três *pools* e, o sorotipo DENV 4 foi detectado em cinco *pools*. Das quatro amostras que apresentaram amplificação em cultura de células, todas foram provenientes de RT-PCR em tempo-real.

Quatro amostras positivas para o vírus da dengue foram posteriormente isoladas. São amostras de *A. aegypti*, sendo uma amostra de fêmea e três que machos, e todas as amostras isoladas eram do tipo DENV-4 (Tabela II).

Tabela II: Resultado da Multiplex-Nested-PCR das amostras de cultura de células.

Pool	GENERO	BAIRRO	ZONA	QTD DE INDIVDUOS	TIPO
ALV 1	Fêmea	Alvorada	Centro-Oeste	4	DENV 4
ADR 2	Macho	Adrianópolis	Centro-Sul	1	DENV 4
CN 1	Macho	Cidade Nova	Norte	2	DENV 4
SA 2	Macho	Santo Antonio	Oeste	4	DENV 4

Quanto a tipificação viral das quatro amostras isoladas, todas apresentaram positividade para o vírus da dengue tipo DENV-4, confirmado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em cadeia com transcrição reversa – RT-PCR seguida de *Multiplex – Nested – PCR*, sendo que em gel de agarose o produto amplificado apresenta banda na altura de 222 pares de base (Foto I).



Foto I: Produto da Multiplex-Nested-PCR, em gel de agarose, visualizado em um transluminador de UV, a 365 nm;

Coluna 1: marcador de 100 pb (InvitrogenTM, USA);

Coluna 2: amostra (ALV 1), na altura de 222 pb, indicando positividade para DENV 4;

Coluna 6: controle positivo (DENV 2), na altura de 316 pb;

Coluna 8: controle negativo (água).

A detecção de vírus da dengue em vetores *A. aegypti* macho se explica pelo fato de que alguns arbovírus, inclusive o vírus da dengue, podem ser transmitidos de forma transovariana à prole, podendo manter infectivas várias gerações desses animais (Nuttall *et al.*, 1994). Das quatro amostras isoladas em cultura de células C6/36 e positivas para o vírus da dengue, uma foi proveniente de mosquitos coletados na zona centro-oeste, uma na zona norte, uma da zona centro-sul, uma da zona oeste.

No caso da RT-PCR em tempo real, foi a única que confirmou positividade em machos de *Aedes aegypti*; isso pode ser explicado devido ao fato de esse método ter um maior tempo de amplificação (40 ciclos), possibilitando a confirmação de positividade mesmo quando a amostra apresenta uma carga viral baixa.

A ocorrência da positividade de mosquitos infectados foi observada em grande parte dos bairros que compõem as diferentes zonas geográficas da cidade de forma heterogênea (com exceção da Zona-Sul). A prevalência de infecção nos mosquitos variou ao longo do período estudado (Gráfico I).

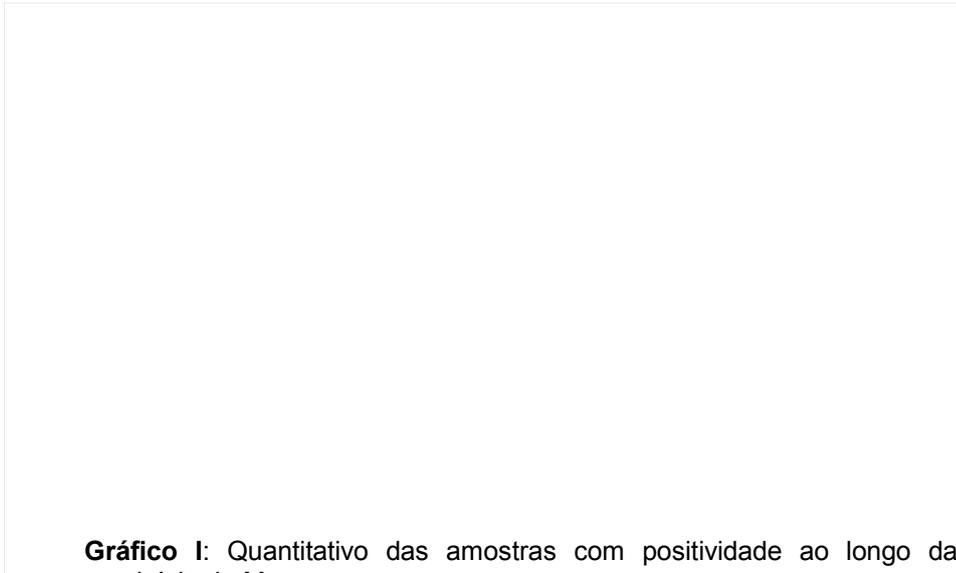


Gráfico I: Quantitativo das amostras com positividade ao longo das zonas geográficas do município de Manaus.

A investigação das taxas de infecção em mosquitos fornece informações sobre os sorotipos circulantes em determinadas localidades, antes que a doença esteja sendo transmitida em níveis mais elevados, possibilitando a implementação de medidas preventivas e evitando epidemias. De acordo com Samuel e Tyagi (2006), mosquitos infectados podem ser detectados até seis semanas antes do começo de surtos.

O monitoramento da circulação viral em vetores, com o uso de diferentes metodologias apresenta-se como alternativa, permitindo identificar com antecedência e confiabilidade os níveis de disseminação do vírus, e se faz extremamente necessário na cidade de Manaus, que apresenta clima ideal para a proliferação de mosquitos e, o fator clima é extremamente importante para a dinâmica de transmissão da dengue (Holmes *et al.* 1998; Teixeira *et al.* 1999), auxiliando a determinar a época e os locais para aplicação de políticas públicas de controle.

4. Conclusão

De acordo com o seguinte trabalho pode-se chegar às seguintes conclusões:

Atualmente, três dos quatro sorotipos (DENV 2, DENV 3 e DENV 4) estão em circulação na população de mosquitos *A. aegypti*.

A não detecção do sorotipo DENV 1, não significa que ele não esteja circulando no município de Manaus, sendo portanto necessário uma maior quantidade de mosquitos para uma melhor caracterização.

Todas as metodologias detectaram positividade, sendo que os sorotipos DENV 2 e DENV 3 foram detectados apenas pelo sistema Lanciotti.

O fato de haver a notificação de positividade em machos de *A. aegypti*, indica que a transmissão transovariana está ocorrido com certa frequência, visto que, das amostras isoladas em culturas de célula, três das quatro que amplificaram são em *Aedes* machos.

5. Referências Bibliográficas

- Bastos, M. S. *Perfil soropidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)* [Dissertação de Mestrado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2004.
- Bronzoni, R. V. M.; Nogueira, R. M. R.; Nunes, M.; Figueiredo, L. T. M. Detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses by multiplex RT-PCR. *J. Clinical Microbiology*, 43: 696-702, 2005.
- Dos Santos, H. et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *J Med Virol* [S.l.], v.80, n.8, p.1426-33, Aug 2008a.
- Figueiredo, M. L. G.; Gomes, A. C.; Amarilla, A. A.; Leandro, A. S.; Orrco, A. S.; Araujo, R. F.; Castro, J. S. M.; Durigon, E. L.; Aquino, V H.; Figueiredo, L. T. M. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virology Journal*; 12: 152, 2010.
- Figueiredo, R. P. M.; Naveca, F. G.; Bastos, M. S. Melo, M. N.; Viana, S. S.; Mourao, M. P.; Costa, C. A.; Farias, I. P. Dengue vírus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 14, 667-669. 2008.
- Holmes, E.C.; Bartley, L. M. & Garnett, G. P. *The emergence of dengue: past, presente, and future*. In: KRAUSE, RM. Emerging infections, Academic Press, Nova York. 1998.
- Lanciotti, R. S.; Calisher, C. H.; Gubler, D. J.; Chang G-J.; Vorndam, V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clinical Microbiology*. 30: 545-551, 1992
- Nuttall, P. A.; Jones L. D.; Labuda, M.; Kaufman, W. R. Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.*, v31, p. 1-9, 1994.
- Sambrook, P. P.; Russel, D. W. *Molecular cloning, a laboratory Manual*, Cold Springharbor, C.S.H.L Press, v.1, 2000.
- Samuel, P. P.; Tyagi, B. K. Diagnostic of methods for detection & isolation of dengue viruses from vectors mosquitoes. *Indian J. Med. Res*, v. 123, p. 615-628, 2006.
- Teixeira, M. G.; Barreto, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.