

## DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITO *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE), CAPTURADOS NA ZONA URBANA NA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS, DE 2012 A JUNHO DE 2013

Antonio José Leão CARDOSO<sup>1</sup>; Cristóvão Alves da COSTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; <sup>2</sup>Orientador CSAS/INPA

### 1. Introdução

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* espécie *Dengue virus* (DENV) e possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (ICTV 2013); causa a principal arbovirose – do inglês *arbovirus* (vírus transmitidos por artrópodes) – em nível mundial e são da maior importância para o nosso país (Fonseca, 2010), e seu principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*, mosquito este antropofílico, tendo sua atividade diurna, e esse se desenvolve em áreas tropicais e subtropicais.

Em uma escala global, aproximadamente 2,5 bilhões de indivíduos em cerca de 100 países estão expostos ao risco de contrair a infecção. Estima-se que ocorram anualmente cerca de 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 500 mil casos de Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome de Choque do Dengue (DHF/DSS), com letalidade de até 10% (Halstead 2007).

A dengue clássica apresenta-se geralmente com febre, dor de cabeça, no corpo, nas articulações e por trás dos olhos, podendo afetar crianças e adultos, mas raramente mata. A dengue hemorrágica é a forma mais severa da doença, pois além dos sintomas citados, é possível ocorrer sangramento, ocasionalmente choque e consequências como a morte (Portal da saúde).

A transmissão não ocorre de pessoa para pessoa, seu principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*. Após um período de 10 a 14 dias, contados do momento em que a fêmea do mosquito faz a ingurgitação do sangue virêmico, esta pode transportar o vírus durante todo seu ciclo de vida e passa a transmitir estes patógenos. Também, ocorre transmissão vertical, por via transovariana, na qual o artrópode passa vírus à sua progênie (Diallo *et al.* 2005).

A fêmea faz a oviposição em recipientes com água, ao saírem dos ovos, as larvas vivem na água por cerca de uma semana, transformando-se então em mosquitos adultos, sendo que do ovo até a fase adulta, o mosquito leva cerca de 10 dias (Nuttall *et al.* 1994).

Os casos de dengue só começaram a ser notificados no estado do Amazonas a partir de 1998, tendo a primeira epidemia ocorrida no mesmo ano, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-2. Estas epidemias foram restritas a Manaus, pois, aproximadamente 50 % da população do estado se concentram na capital (Bastos 2004). Ainda de acordo com o mesmo autor, a co-circulação de dois sorotipos da segunda epidemia mostrou que sucessivas infecções são responsáveis pelo aparecimento das formas clínicas mais severas da doença, e foram então registrados os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue no município de Manaus.

Em 2002 foi isolado o DENV 3 de um paciente procedente da Bahia, a partir daí, outros casos de DENV 3 foram diagnosticados por isolamento viral. O sorotipo DENV 4 foi isolado pela primeira vez de casos autóctones em Manaus no ano de 2008 (Figueiredo, 2008).

Hoje, os quatro sorotipos do vírus dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4), co-circulam na cidade de Manaus.

Atualmente, a vigilância virológica do mosquito vetor é utilizada, e pode servir como advertência para os sistemas de monitoramento de surtos de dengue, prevenindo epidemias (Chow *et al.* 1998; Samuel e Tyagi 2006). No ano de 2013 no estado do Amazonas, de acordo com boletim do Ministério da Saúde, foram registrados 3.008 casos de dengue em março e 784 casos em abril, sendo o estado onde houve maior ocorrência da doença na Região Norte.

O Principal objetivo do trabalho foi identificar o vírus da dengue em mosquitos *Aedes aegypti* capturados em bairros da cidade de Manaus por um período de 10 meses, entre agosto de 2012 a maio de 2013 e determinar os sorotipos de dengue vírus (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4), que estejam em circulação nos vetores positivados.

### 2. Material e Métodos

Foi realizado um estudo longitudinal com duração de 12 meses para identificação do vírus Dengue direto de vetores *Aedes aegypti* em circulação ao longo do município de Manaus. Este projeto faz parte de um projeto maior, o PRONEX, que é um estudo do dengue nas Regiões Norte e Sudeste do Brasil, com vista à criação de uma rede interdisciplinar de pesquisa básica e aplicada, tendo como instituição mantenedora a USP de Ribeirão Preto.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o laboratório de Entomologia da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD, FIOCRUZ Amazônia), pela equipe do Dr. Sérgio Luz.

Os espécimes coletados foram identificados, fazendo uso de chave de identificação (Forattini 2002). Foram agrupados em número de até 10 animais por microtubo (*pool*) e, em seguida, estocados a -70°C.

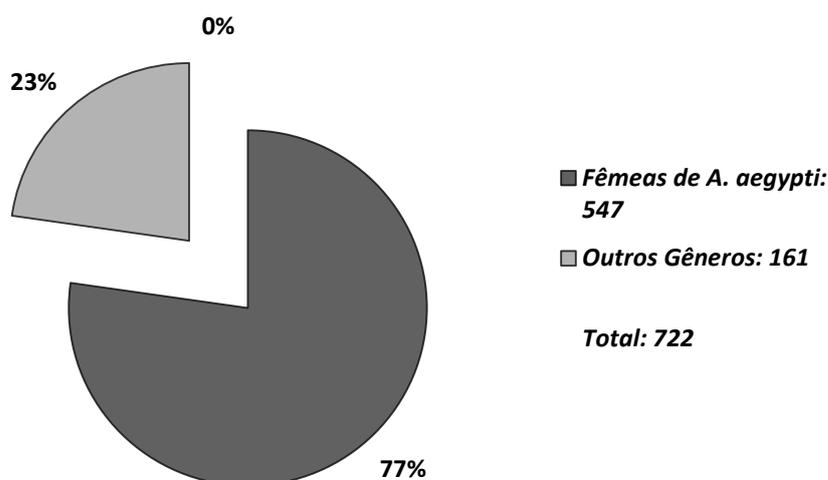
Os *pools* foram macerados e tiveram seu genoma viral extraído de acordo com o método *Axy Prep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprepkit* (Axygen, USA), seguindo instruções do fabricante.

Uma vez extraído, o RNA viral foi submetido a uma RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase) convencional, para detecção do gênero *Flavivirus*, seguida de uma *Multiplex-Nested-PCR* para identificação de espécie de DENV, ambos baseados no tamanho dos *amplicons*, (Bronzoni *et al.* 2005).

Para a detecção do produto amplificado, foi feita EGA (Eletroforese em Gel de Agarose), na concentração de 1,8%, utilizando o tampão TBE a 1X, com voltagem de 100V. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, a visualização de bandas foi feita em um transluminador de luz ultravioleta (Sambrook *et al.* 2000) e fotografado com câmera digital.

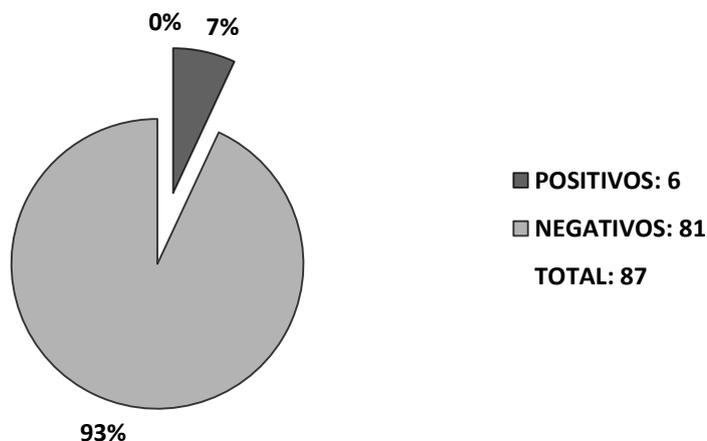
### 3. Resultados e Discussão

Durante o período de agosto de 2012 a maio de 2013 foram coletados 722 mosquitos ao longo dos bairros do município de Manaus, sendo 547 fêmeas de *A. aegypti*, e 161 a outros gêneros de culicídeos (Gráfico 1).

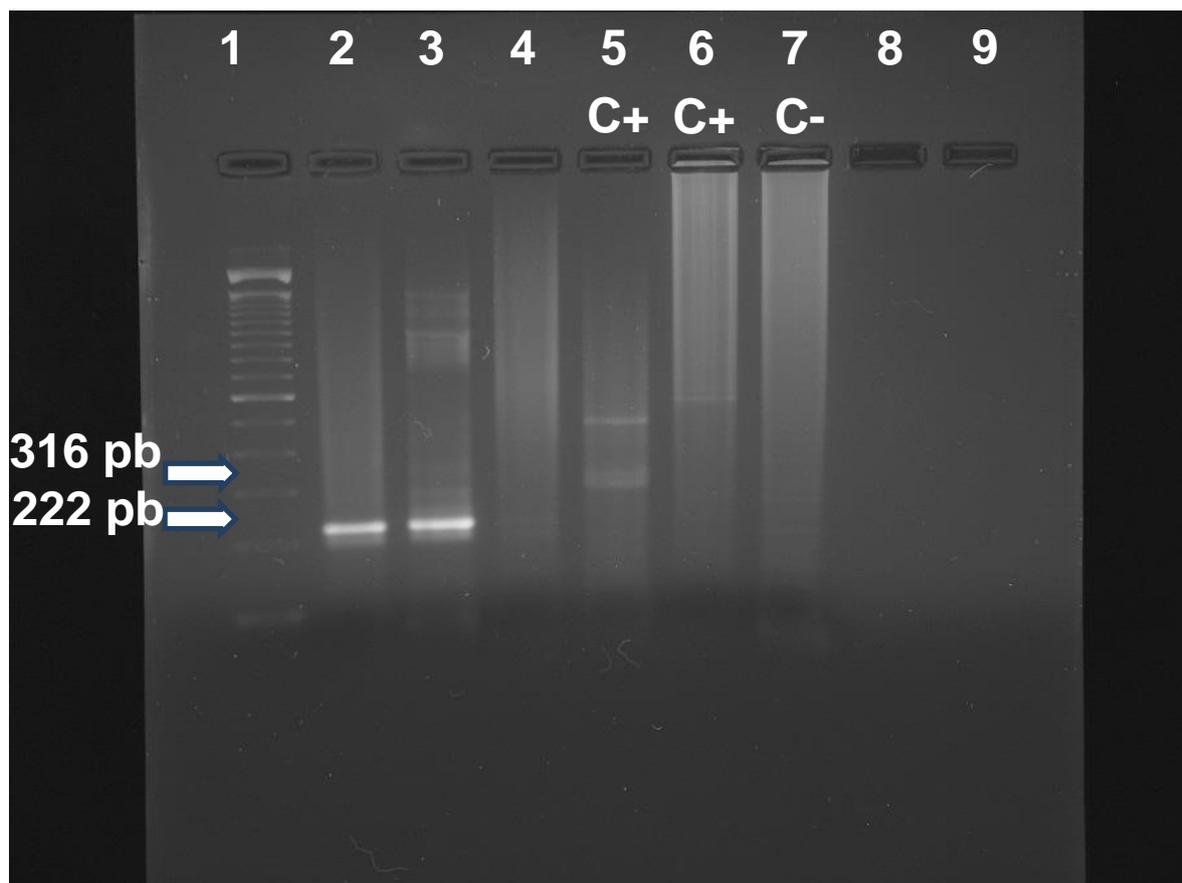


**Gráfico 1:** Quantitativo de espécimes coletados no período de agosto de 2012 a junho de 2013, no município de Manaus.

As fêmeas coletadas, depois de organizadas geraram 87 *pools*, que foram processados pela técnica de RT-PCR. Dentre as amostras analisadas, seis *pools* foram positivos, sendo três para o sorotipo DENV-2, um para o sorotipo DENV-3 e dois para o sorotipo DENV-4 (Foto 1), gerando uma positividade de 7% (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Frequência do vírus dengue em fêmeas de *A. aegypti*.



**Foto 1:** Foto de Gel de Agarose corado com brometo de etídio mostrando os *amplicons* oriundos de Multiplex-NESTED-PCR. Canais 1 ao 4: amostras. Canais 2 e 3, *amplicon* na altura de ~222pb indicando positividade para DENV-4, de acordo com o protocolo de Bronzoni (*et al.*, 2005). Canais 5 e 6: C+ (DENV-2); Canal 7: C- (H<sub>2</sub>O).

As arboviroses estão amplamente distribuídas no Brasil e estão frequentemente associadas a surtos ou epidemias em seres humanos, representando um sério problema de saúde pública, com implicações econômicas e sociais (Rosa *et al.* 1998).

No presente trabalho foi detectada a presença de três dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-2, DENV-3 e DENV-4) circulando na população de mosquitos *Aedes aegypti*.

Considerando o homem como o principal hospedeiro do ciclo de transmissão urbano do vírus dengue, a detecção de três dos quatro sorotipos (DENV 2, DENV 3 e DENV 4) é um indicativo preocupante, pois, a presença de positividade e detecção de mais de um tipo circulante do vírus deve servir de alerta, pois a febre hemorrágica do dengue (DHF) ocorre principalmente após epidemias de febre do dengue, seguindo de introdução de um sorotipo diferente ao anterior (Halstead 1997).

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.

#### 4. Conclusão

De acordo com os dados obtidos, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

O diagnóstico da infecção vetorial dos mosquitos *Aedes aegypti* com a técnica de RT-PCR revelaram a presença de mosquitos desta espécie infectados com três dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-2, DENV-3 e DENV-4).

A não detecção do sorotipo DENV 1, não significa que ele não esteja circulando no município de Manaus, devido à quantidade de amostras ser relativamente pequena, sendo necessário tanto um maior tempo de pesquisa quanto uma quantidade mais significativa de amostras.

## 5. Referências Bibliográficas

- Bastos, M.S. 2004. *Perfil soropidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 80pp.
- Bronzoni, R.V.M.; Nogueira, R.M.R.; Nunes, M.; Figueiredo, L.T.M. 2005. Detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses by multiplex RT-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 696-702.
- Chow, V.T.K.; Chan, Y.C.; Yong, R.; Lee, K.M.; Lim, L.K.; Chung, Y.K.; Lamphua, S.G.; Tan, B.T. 1998. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes Albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(5): 578-582.
- Diallo, M.; Sall, A.A.; Moncayo, A.C.; Ba, Y.; Fernandez, Z.; Ortiz, D.; Coffey, L.L.; Mathiot, C.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. 2005. Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 445-449.
- Figueiredo, R.P.M.; Naveca, F.G.; Bastos, M.S. Melo, M.N.; Viana, S.S.; Mourão, M.P.; Costa, C.A.; Farias, I.P. 2008. Dengue vírus type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 14, 667-669.
- Fonseca, B.A.L.; Figueiredo, L.T.M. Dengue. 2010. In: Focaccia, R. (ed.). *Tratado de Infectologia*, 4a Edição. Atheneu, São Paulo. Parte II, Cap.13, p.397-410.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidaeologia médica*. São Paulo, USP. v.2, 860p.
- Halstead, S.B. 1997. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler DJ, Kuno G (ed.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Cab International, London, p. 23-44.
- HALSTEAD, S.B. 2007. Dengue. *Lancet*, 370: 1644-165207.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, 2013 (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>). Acesso em 17/05/2013.
- Nuttall, P.A.; Jones, L.D.; Labuda, M.; Kaufman, W.R. 1994. Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of Medical Entomology*, 31: 1-9.
- Portal da Saúde*, 2013 ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23620&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23620&janela=1)). Acesso em 03/03/2013.
- Rosa, J.F.S.T.; Rosa, A.P.A.T.; Vasconcelos, P.F.C.; Pinheiro, F.P.; Rodrigues, S.G.; Travassos da Rosa, E.S.; Dias, L.B.; Cruz, A.C.R. 1998. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. In: Rosa, A.P.A.T.; Vasconcelos, P.F.C.; Rosa, J.F.S.T. (eds). 1998. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 19-31.
- Sambrook, P.P.; Russel, D.W. 2000. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. , v.1. Cold Spring Harbor, C.S.H.L Press.
- Samuel, P.P.; Tyagi, B.K. 2006. Diagnostic of methods for detection & isolation of dengue viruses from vectors mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research*, 123: 615-628.