

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS EM VETORES DO GÊNERO *Aedes* NO MUNICÍPIO DE MARINGÁ.

Vitória Belucci Frachinconi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dennis Armando Bertolini (Orientador). E-mail: dabertolini@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Virologia.

Palavras-chave: Arbovírus; *Aedes*; Maringá.

RESUMO

Os arbovírus vêm, a cada ano, atingindo um maior número de pessoas através de seu vetor urbano: *A. aegypti* e *A. albopictus*. No Brasil, os arbovírus mais comuns são o vírus da dengue, chikungunya e Zika vírus, que possuem similaridade dos sintomas e reatividade cruzada dos testes sorológicos. Em vista disso, o objetivo desse projeto foi, através dos vetores do gênero *Aedes* capturados no município de Maringá, realizar a padronização de uma metodologia molecular para detecção desses arbovírus. Foi realizada a coleta de insetos adultos, larvas ou pupas em 10 bairros, extração do material genético e a RT-qPCR. A partir da formação dos pools de mosquitos foi possível detectar DENV-2 em duas amostras de uma mesma localidade no município de Maringá. Podemos concluir que o uso dessa técnica pode ser utilizado para realizar o mapeamento antecipado dos sorotipos circulantes no município antes que haja surgimento de casos em seres humanos.

INTRODUÇÃO

O progresso da urbanização vem contribuindo para maior distribuição geográfica dos mosquitos vetores do gênero *Aedes* e, conseqüentemente, na disseminação dos arbovírus (vírus transmitidos através de artrópodes) especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Lura *et al.*, 2022).

No estado do Paraná, no período epidemiológico compreendido entre as semanas epidemiológicas 31/2023 e 30/2024, foram notificados 595.732 casos confirmados, com uma incidência de 4.532 casos/100 mil habitantes, sendo 13.234 casos graves e 610 óbitos de dengue (Paraná, 2024a). Na 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná (15ªRS) foram notificados 41.510 casos confirmados de dengue. Com

relação a Chikungunya foram notificados 1.895 casos, dos quais 212 foram confirmados, e nenhum óbito. Apesar de serem notificados 144 casos de Zika Vírus, nenhum foi confirmado (Paraná, 2024a).

Dessa forma, pretende-se com este projeto, a padronização de uma metodologia molecular para a detecção de arbovírus em vetores do gênero *Aedes* capturados no município de Maringá.

MATERIAIS E MÉTODOS

As áreas para a realização da coleta de larvas, pupas, ovos e insetos adultos foram selecionadas com base nas informações de distribuição de casos de dengue no município de Maringá, fornecidas pela Gerência de Vigilância de Zoonoses e Vetores da Secretaria de Saúde. A coleta dos ovos foi realizada com armadilhas de oviposição (ovitampas), instaladas no solo, durante um período de 14 dias, sendo que ao sétimo dia a ovitampa foi retirada e substituída por outra, e então recolhidas. Essas palhetas de madeira foram encaminhadas ao laboratório e transferidas para um recipiente contendo água até a eclosão dos ovos. Os insetos já adultos foram mantidos em um recipiente próprio por até cinco dias. Após a identificação e confirmação que os insetos pertenciam ao gênero *Aedes* foram armazenados em ultrafreezer -80°C, até o processamento das amostras.

Foram selecionados de 15 a 30 indivíduos de insetos adultos, de cada localização e espécie, para formar pool de amostras. Os insetos foram triturados em um tubo criogênico utilizando o disruptor de células L-Beater 3 (Loccus Ltda., São Paulo, Brasil), com o auxílio de beads 2 mm. A extração do RNA total foi realizada com o kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin-Quibasa Ltda., Minas Gerais, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen) e quantificadas em equipamento NanoDrop2000 (Thermo Scientific). Quanto às reações de RT-qPCR, foram realizadas através do kit Biomol ZDC (Instituto de Biologia Molecular do Paraná [IBMP], Paraná, Brasil), e do equipamento Applied Biosystems QuantiStudioTM 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. A reação de amplificação foi validada pelo uso do Controle Interno de Amplificação (IAC) (IAC-50, Nova Biotecnologia Ltda., São Paulo, Brasil), conforme as especificações do fabricante, e de controles positivos para os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV), do Zika vírus e do Chikungunya, cedidos pelo Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A amplificação consistiu em: 1 ciclo de 20 minutos a 50 °C para transcrição reversa; 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C para ativação da polimerase; 40 ciclos de 15

segundos a 95 °C para desnaturação e; 40 ciclos de 1 minuto a 60 °C para o anelamento e polimerização. As amostras foram consideradas positivas quando apresentarem um limiar do ciclo (Ct, do inglês, Cycle Threshold) menor ou igual a 37. O resultado da amplificação foi analisado no software do próprio equipamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de fevereiro de 2023 a junho de 2024 foram capturados 923 amostras do gênero *Aedes* em 10 bairros do município de Maringá (Conjunto Habitacional Hermann Moraes Barros, Conjunto Residencial Paulino Carlos Filho, Jardim Copacabana, Jardim Dourados, Jardim Oásis, Jardim Tabaetê, Loteamento Batel, Parque das Grevíleas, Vila Moranguera e Zona 04), nas quais 918 sendo da espécie *Aedes aegypti*, e as 5 restantes de *Aedes albopictus*.

As amostras foram divididas em 68 pools com, em média, 13,5 mosquitos adultos por pool. Do total de 68 pools, foi possível detectar a presença do sorotipo DENV-2 em dois pools, ambos formados por insetos adultos de *A. aegypti*, onde foi realizada a captura de larvas, pupas e ovos depositados na ovitrampa. O primeiro pool positivo foi formado por 21 mosquitos adultos, apresentando um Ct de 32,1, e o segundo pool formado por 15 mosquitos adultos, apresentando um Ct de 31,5, sendo que, para ambos os pools os mosquitos foram coletados no Loteamento Batel (Figura 01).

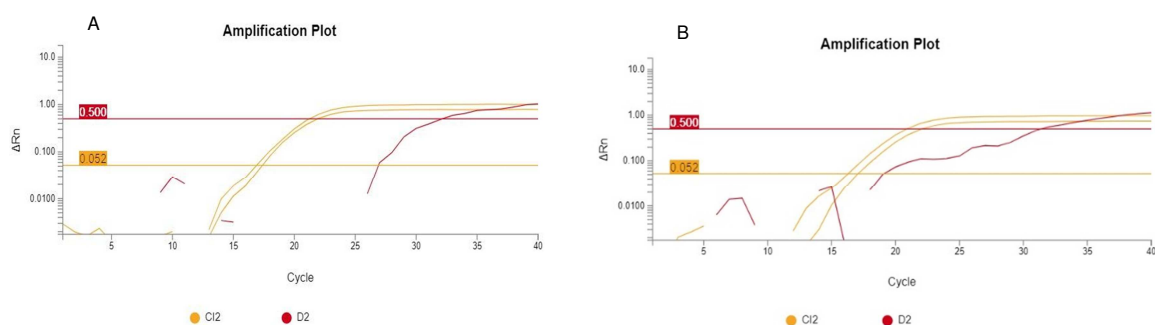


Figura 01 - Curva de amplificação de RT-qPCR detectável para DENV-2. (A) Pool de 21 mosquitos; (B) Pool de 15 mosquitos. **Legenda:** CI2: controle interno 2 (em amarelo); D2: vírus da dengue sorotipo 2 (em vermelho).

De acordo com os informes epidemiológicos da Secretaria de Saúde do estado do Paraná (Paraná, 2024b), até o momento da coleta, tem sido observado a co-circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 no estado do Paraná, entretanto, até a

data que foi realizada a coleta das amostras não havia sido registrado a circulação do sorotipo 2 no município de Maringá, o que discorda dos resultados encontrados.

CONCLUSÕES

A partir desse estudo foi possível detectar o sorotipo DENV-2 através da RT-qPCR utilizando mosquitos adultos de *Aedes aegypti* capturados no município de Maringá. Sendo assim, há possibilidade de uso dessa técnica para realizar o mapeamento antecipado dos sorotipos circulantes no município antes que haja surgimento de casos em seres humanos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Fundação Araucária e a Universidade Estadual de Maringá pela concessão da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

PARANÁ. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Arbovirose Dengue. Informe Epidemiológico, n. 47, 2023-2024, Semana Epidemiológica 31 a 30. 2024a. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.documentador.pr.gov.br/documentador/pub.do?action=d&uuid=@gtf-escriba-sesa@e76cff99-29f5-4028-94f8-1fb960d8f6af&emPg=true>. Obtido em: 19/08/2024.

LURA, T. et al. A validated triplex RT-qPCR protocol to simultaneously detect chikungunya, dengue and Zika viruses in mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 59, n. 3, p. 198, 2022.

PARANÁ. Informe epidemiológico 16/2023-2024. 2024b. Disponível em: <https://www.documentador.pr.gov.br/documentador/pub.do?action=d&uuid=@gtf-escriba-sesa@0c4edb97-bc14-48df-86dd-9798d043d924&emPg=true>. Obtido em: 26/08/2024.