

CARACTERIZAR O VÍRUS DA DENGUE (DENV) QUANTO AOS SEUS SOROTIPOS EM POPULAÇÕES DE CAXIAS/MA

Paulo R. S de Sousa^{1*}, Alessandra M. S Vidigal², Ana P.M Olimpio², Elmary C. Fraga³, Maria C. Barros³
1*. Estudante de Licenciatura em Ciências Biológicas CESC/ Universidade Estadual do Maranhão- UEMA
2. Mestre em Biodiversidade Ambiente e Saúde, CESC-UEMA
3. Prof. do departamento de Química e Biologia, CESC-UEMA

Resumo

A dengue é hoje a arbovirose de maior importância, pois constitui um sério problema de saúde pública no mundo. O vírus da dengue pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e apresenta quatro sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Essa pesquisa objetivou detectar e diferenciar os sorotipos do vírus da dengue em pacientes do município de Caxias/MA. Foram obtidos 31 amostras de sangue de pacientes que apresentavam os sintomas de dengue deste município a partir dos centros de saúde de Caxias/MA. As amostras foram levadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA, onde foi realizada a extração do RNA viral, amplificação gênica via RT-PCR e *nested*-PCR e sequenciamento. As técnicas moleculares revelaram a presença dos sorotipos DENV-2 e DENV-4, sendo que o DENV-4 já havia sido registrado para o município mas o DENV-2 foi revelado como novo registro. Este resultado revela a circulação de dois sorotipos da dengue no município de Caxias/MA.

Autorização Legal: Comitê de ética Nº 2.217.186

Palavras-chaves: *Aedes. aegypti*, RT-PCR, Sangue

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA

Introdução

A dengue é uma doença sistêmica causada por um arbovírus, comum em muitas regiões tropicais e subtropicais, mantidos na natureza através de um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados, como primatas não humanos e humanos e o mosquito hematófago *Aedes aegypti* (ROUNDY et al., 2017). O ciclo de vida deste mosquito inicia-se após a deposição dos ovos por uma fêmea em um criadouro com água que eclodem quando em contato com esta, no entanto, dependendo do criadouro, os ovos podem permanecer sem eclodir por um grande período de tempo, aguardando até o próximo período chuvoso para a eclosão (SANTOS, 2009).

O vírus dengue (DENV) pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER; CLARK, 1995). Este possui genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva, contendo 11.000 pb com 10 genes contidos em uma cadeia simples (SOUSA, 2014).

Em 2019, até a Semana epidemiológica 34 (30/12/2018 a 24/08/2019), foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 690,4 casos/100 mil habitantes. Em relação a região Nordeste foram registrados 177.677 casos, para o estado do Maranhão foram notificados 5.048 casos de dengue no mesmo período (BRASIL, 2019). Os sinais da presença da dengue são: Febre, fadiga, erupção cutânea, dor reto orbital, artralgia e mialgia, vômitos e leucopenia, casos mais extremos podem incluir hemorragias graves (COSTA, 2017).

Os métodos usuais para o diagnóstico da infecção pelo DENV são feito com base nos dados epidemiológicos e testes laboratoriais, a saber: Isolamento viral, transcrição reversa seguida de Reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e detecção de anticorpos por testes imunes enzimáticos (SILVA, 2013). Neste contexto objetivou-se nesta pesquisa detectar e diferenciar os sorotipos do vírus da dengue em pacientes no município de Caxias/MA.

Metodologia

No biênio 2019/2020 foram obtidos 31 amostras de sangue de pacientes que apresentavam os sintomas de dengue nos centros de saúde e hospitais da rede pública do município de Caxias/MA. As amostras foram levadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA, onde foram armazenadas em freezer -85 °C.

O RNA viral foi isolado a partir de amostras de sangue utilizando-se kit SV Total RNA Isolation System da Promega Corporation, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A partir do RNA foi realizado a amplificação genica pela Transcrição Reversa (RT-PCR) para obtenção do cDNA e reação de *nested*-PCR para a identificação individual de cada sorotipo conforme descrito em Lanciotti et al., (1992). A amplificação consistiu de duas etapas, primeiro fez-se uma reação (RT-PCR) para obtenção dos quatro sorotipos do vírus simultaneamente em uma segunda reação (*nested*-PCR) foram gerados amplicons com tamanhos (pb) específicos para cada sorotipo, permitido assim a detecção dos sorotipos individualmente a partir de oligonucleotídeos específicos para cada DENV.

De forma geral para primeira etapa de amplificação (RT-PCR) são utilizados primers consensuais (D1 -

upstream e D2 - downstream) para anelar qualquer um dos quatro sorotipos; na segunda etapa (*nested-PCR*) são utilizados *primers* específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 respectivamente. As amplificações gênicas ocorreram em um termociclador em duas etapas, na primeira etapa: reação de RT-PCR, foi obedecido os seguintes parâmetros 45 °C durante 45 minutos para transcrição reversa, seguido de 92 °C por 2 minutos para inativação da transcriptase, 30 ciclos compreendendo desnaturação a 94 °C por 35 segundos, hibridização a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, após essa ciclagem, 10 minutos de extensão final, a 72 °C. Na segunda etapa (*nested-PCR*) os produtos da primeira etapa foram previamente diluídos e submetidos a ativação da enzima a 95 °C por 2 minutos, seguido de 18 ciclos: desnaturação a 94 °C por 35 segundos, hibridização a 56 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos, após essa ciclagem um período de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A eficiência do ensaio da amplificação foi verificado em gel de agarose 2%, adicionando no gel 8ul do produto obtido na *nested-PCR* e 2ul de tampão (Blue/Orange 6X Loading Dye). Os fragmentos foram separados por eletroforese com uso de 85 Volts durante 60 minutos (SAMBROOK et al.,1989). Para a determinação do tamanho dos produtos amplificados foi incluído no gel um marcador de peso molecular (DNA ladder) de 1.000 pares de bases. Após a eletroforese, os géis foram observados em transluminador com Luz Ultra Violeta (UV). As amostras positivas da *nested-PCR* foram sequenciadas, segundo o método de Sanger et al., (1977), no sequenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyser.

Resultados e Discussão

No biênio 2019/2020 obteve-se 31 amostras de indivíduos do município de Caxias/MA que apresentaram suspeita clínica de infecção pelo vírus da dengue, cinco destes apresentaram positividade para a dengue no diagnóstico molecular, sendo dois do tipo DENV-4 com pesos moleculares entre 350 e 400 pb (Figura 1) e três do tipo DENV-2 com peso molecular entre 100 e 150 pb (Figura 2 A e B). O DENV-4 já havia sido identificado para o município de Caxias/MA por Carvalho (2015), no entanto, o DENV-2 é registro novo para este município.

Figura 1. Gel de agarose mostrando a positividade da técnica *nested-PCR* para o vírus DENV-4 em dois pacientes 1 e 2. PM: Peso Molecular.

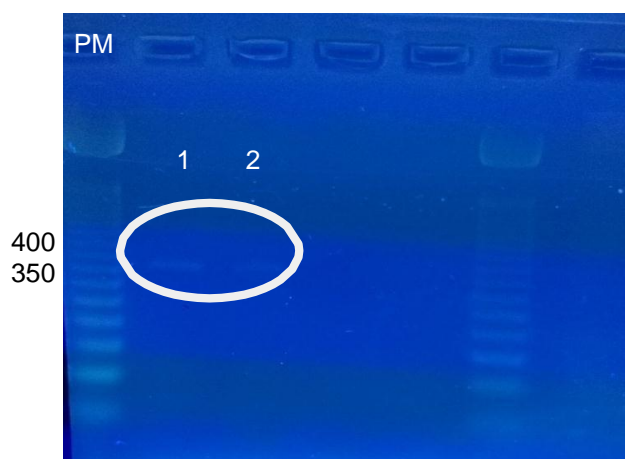
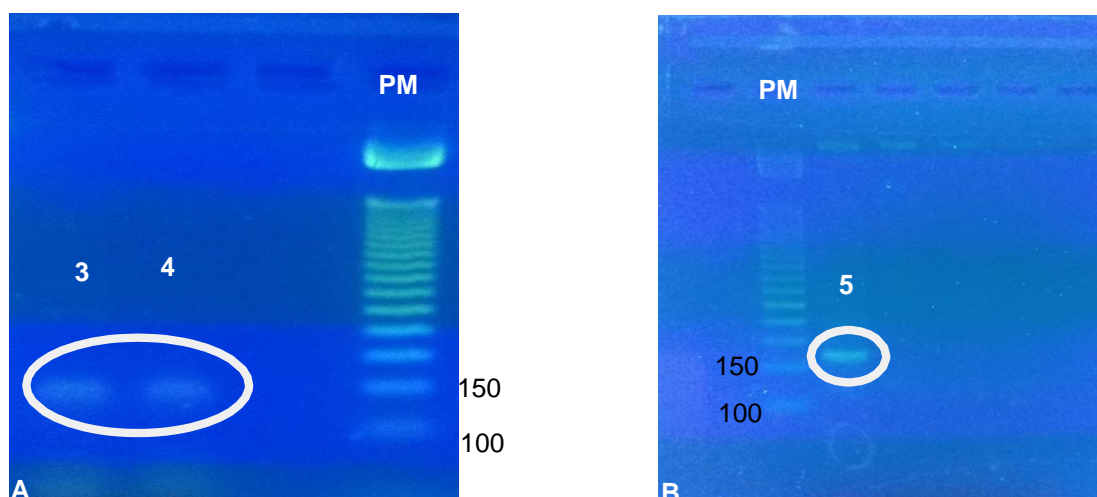
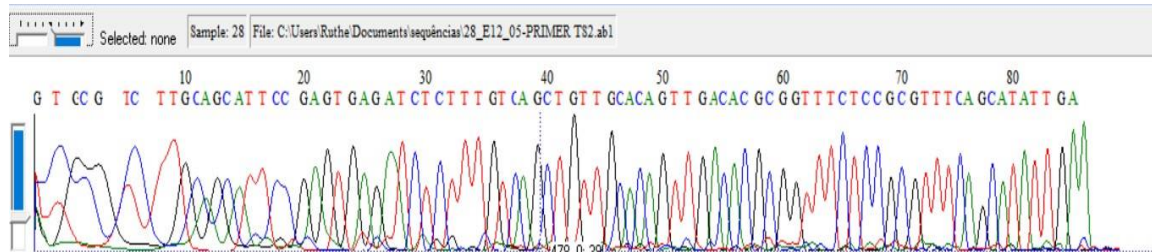


Figura 2. Gel de agarose mostrando a positividade da técnica *nested-PCR* para o vírus DENV-2. Em A pacientes 3 e 4. Em B paciente 5. PM: Peso Molecular.



Obeve-se sequenciamento positivo para o paciente 5 (Figura 3), esta sequência foi plotada na plataforma Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que revelou uma similaridade de 97,47%, com o DENV-2 (MCVR2188/AB/2016 - MH891768.1), validando assim esse sorotipo para o município de Caxias/MA. Vale ressaltar que no ano de 1996, foi isolado pela primeira vez em São Luís, capital do estado do Maranhão, o sorotipo 1 (DENV-1) e no ano de 2001 o sorotipo 2 (DENV-2). No ano de 2002, foram detectados os primeiros casos de dengue hemorrágico, o que coincidiu com a introdução e posterior prevalência do sorotipo 3 (DENV-3) (NETO & REBÊLO, 2004). Desde então, os três sorotipos – DENV-1, DENV-2 e DENV-3 – cocircularam no município de São Luis/MA (SILVA et al., 2010).

Figura 3. Eletroferograma mostrando a positividade da sequência do sorotipo viral 2.



A introdução de um novo sorotipo numa população que já convive com a circulação dos outros sorotipos pode aumentar a incidência da forma clínica à grave: a dengue hemorrágica (SARDI et al., 2013). No estudo de Martins et al., (2014) para o Brasil o DENV-2 foi o sorotipo predominante (46.2%), seguido do DENV-4 (29%), DENV-1 (10.0%) e DENV-3 (9.2%).

Em 2007/2008 o DENV-2 causou uma das maiores epidemias de dengue da história do Brasil, com cerca de 491 mortes. Embora o genótipo isolado tenha sido o mesmo da sua introdução no Brasil, observou-se a emergência de uma nova linhagem (linhagem II) apresentando asparagina, que é uma mutação associada a febre hemorrágica da dengue (FHD) em cepas de origem Asiática (FARIA et al., 2013).

A primeira forte evidência em relação aos determinantes genéticos na gravidade de casos de dengue veio através de estudos com DENV-2, que indicaram que o genótipo asiático está associado com a gravidade da doença, enquanto que isolados de genótipo Americano não estão (RICO-HESSE et al., 1997). Além disto, os sorotipos DENV-1 e DENV-3 estão associados a FHD em infecções primárias, enquanto que DENV-2 e DENV-4 foram associados com FHD em infecções secundárias (ANANTAPREECHA, 2005).

O diagnóstico precoce da dengue é fundamental, pois alguns pacientes podem evoluir de uma doença leve à grave em um curto período (BRASIL, 2011). De acordo com Rothman (2004) embora a patogênese da dengue não seja totalmente clara, acredita-se que múltiplos sorotipos circulantes; fatores do hospedeiro como infecção secundária, morbidades, polimorfismo genético e fatores relacionados ao sorotipo ou genótipo do vírus determinariam a evolução das formas clínicas da dengue.

Conclusão

O resultado obtido a partir deste estudo é um indicativo da circulação de pelo menos dois sorotipos da dengue, DENV-4 e DENV-2, no município de Caxias/MA. A ocorrência do DENV-2 no município de Caxias foi o primeiro registro para o município. Sendo assim, acredita-se na necessidade da continuidade desta pesquisa com o apoio da vigilância epidemiológica e das unidades de saúde de Caxias/MA, a fim de se obter informações sobre a disseminação do vírus no estado e consequentemente auxiliar no controle da doença dengue.

Referências bibliográficas

- ANANTAPREECHA, S. Serological and virological features of dengue fever and dengue hemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol. Infect.*, 2005.
- BRASIL. Ministério da saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico - adulto e criança, 4ª edição Brasília, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue. *Boletim Epidemiológico*, Secretaria de vigilância em Saúde, vol.49, Nº 57, 2019.
- CARVALHO ACP. Identificação dos sorotipos do Vírus da dengue por Multiplex-RT-PCR em amostras de soro de pacientes do Estado do Maranhão. Dissertação. UNICEUMA, 2015.
- CASSEB AR, CRUZ AV, JESUS IS, CHIANG JO, MARTINS LC, SILVA SP. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014.
- COSTA AC. Caracterização molecular do vírus da dengue pela análise do genoma completo viral em amostras de doadores e receptores de sangue nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP, São Paulo, 2017.
- FARIA NR, NOGUEIRA RN, FILLIPIS, SIMOES JB, NOGUEIRA F de B, ROCHA QUEIROZ, SANTOS FB. Twenty years of dengue-2, activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated 1990 to, 2013.
- GUBLER DJ, CLARK, GG. Dengue/ dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem *Emerging Infectious Diseases*, 1995.

- IBGE. www.ibge.gov.br. Estatísticas, censo 2019, características da população. Acesso em Janeiro de 2020.
- LANCIOTTI RS, CLAISHER CH, GUBLER DJ, CHANG GJ, VORNDAM AV. Detecção e tipagem rápida da dengue a partir de amostras clínicas por meio da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. *Jornal de microbiologia clínica*, 1992.
- NETO VSG, REBÊLO JMM. Aspectos epidemiológicos do dengue no Município de São Luís, Maranhão, Brasil, 1997-2002. *Cad Saúde Pública* 5: 1424-1431, 2004.
- RICO-HESSE R, HARRISON LM, SALAS RA. - Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the America. *Virology*, 230: 244-251, 1997.
- ROTHMAN A. Dengue: definindo imunidade protetora versus patológica. *J Clin Inves*, 2004.
- ROUNDY CM, AZAR SR, ROSSI SL, HUANG JH, LEAL G, YUNR. Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for zika virus transmission. *Emerge Infect Dis*, 2017.
- SAMBROOK J, FRITSCHI EF, MANIATIS T. *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.74, n.12 p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, VS dos, "Ciclo de vida do *Aedes aegypti*", Brasil Escola. Disponível em <http://brasilecola.com.br/ciclo-de-vida-aegypti.htm>. acesso em 26 de janeiro de 2019.
- SARDI SI, PACHECO LGC, CARMO EH. Diagnóstico e caracterização molecular do vírus Dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, 2013.
- SILVA FDV, SOARES DL, JESUS SMC, CALDAS AJM, AQUINO DMC, MONTEIRO CA. Manifestações clínicas da febre hemorrágica do dengue associada aos principais sorotipos virais. *Rev Pesq Saúde*, 2010.
- SILVA AM. Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas. Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- SOUSA DMC. Caracterização genética e evolução dos vírus Dengue no Estado do Rio Grande do Norte. Dissertação (mestrado em Sistemática e Evolução) – Centro de Biociências - UFRN, Natal, 2014.