

DETECÇÃO DE FLAVIVIRUS E ALPHAVIRUS EM MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) CAPTURADOS EM REGIÃO PRÓXIMA À TRÊS LAGOAS – MS

Recebido em: 24/02/2023

Aceito em: 29/03/2023

DOI: 10.25110/arqsaude.v27i3.2023-011

Isabella do Vale Francisco Bortolato ¹
Mitzy Stephanny Machado ²
Ana Julia Silva Rodrigues Carvalho Leite ³
André Valério da Silva ⁴
Juliano Yasuo Oda ⁵
Aline Rafaela da Silva Rodrigues Machado ⁶
Alex Martins Machado ⁷

RESUMO: Introdução: Arbovírus são causadores de doenças humanas, sendo que mudança ecológicas e aumento do contato humano-vetor aumenta a possibilidade de surtos. Objetivo: Detectar, identificar e caracterizar arbovírus presentes em mosquitos vetores capturados em regiões de mata próximas a Três Lagoas, MS. Metodologia: Mosquitos foram capturados utilizando armadilhas de luz em regiões de mata circunvizinha a Três Lagoas. Os mosquitos capturados foram classificados por gênero (chave morfológica) e agrupados em pools com até 20 espécimes, e utilizados através da reação de RT-PCR com posterior sequenciamento e análise filogenética. Resultados: Foram capturados 851 dos gêneros: *Culex* spp. (11 pools); *Aedes* spp. (13 pools); *Haemagogus* spp. (7 pools) e outros gêneros não identificados. Sequências de vírus Dengue (DENV) foram amplificadas de 2/13 (15,38%) pools de *Aedes* spp. e uma sequência de vírus Mayaro (MAYV) 1/7 (7,7%) foi amplificada de pools de *Haemagogus* spp. As análises filogenéticas mostraram que as sequências de DENV agrupava-se no clado de DENV1 e DENV2. A sequência de MAYV agrupou-se junto a sequências de amostras de infecções humana por MAYV do grupo L. Conclusão: Estes resultados reforçam a circulação de DENV, que é causador de surtos anuais de doenças febris agudas no município, e detecção, por primeira vez na região, a circulação de MAYV, reforçando a necessidade de monitoramento viral constante nessa região.

¹ Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Três Lagoas. E-mail: isa_bortolato@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-8704-2546>

² Graduanda em Farmácia. Universidade Federal de São João del-Rei - Divinópolis.

E-mail: mjih.stephanny.machado@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2144-819X>

³ Graduanda em Medicina. Universidade do Oeste Paulista em Guarujá. E-mail: anajuliasr99@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1561-9136>

⁴ Doutor em Biologia Geral e Aplicada pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Três Lagoas.

E-mail: andre.valerio@ufms.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0309-5394>

⁵ Doutor em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Três Lagoas. E-mail: juliano.yasuo@ufms.br

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2233-8291>

⁶ Doutora em Investigação Biomédica pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). E-mail: aline.r.machado@ufms.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2977-075X>

⁷ Pós-Doutorando do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Bioquímica da University of Tennessee Health Science Center (UTHSC) em Memphis - TN, USA. E-mail: alex.machado@ufms.br

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6118-2042>

PALAVRAS-CHAVE: Dengue; Mayaro; Arbovirus; Culicidae.

**DETECTION OF FLAVIVIRUS AND ALPHAVIRUS IN MOSQUITOES
(DIPTERA: CULICIDAE) CAPTURED IN A REGION CLOSE TO TRES
LAGOAS – MS**

ABSTRACT: Introduction: Arboviruses cause human diseases, and ecological changes and increased human-vector contact increase the possibility of outbreaks. Objective: To detect, identify and characterize arboviruses present in mosquito vectors captured in forest regions close to Tres Lagoas, MS. Methodology: Mosquitoes were captured using light traps in forest regions surrounding Tres Lagoas. The captured mosquitoes were classified by gender (morphological key) and grouped into pools with up to 20 specimens and used through the RT-PCR reaction with subsequent sequencing and phylogenetic analysis. Results: 851 of the genera were captured: *Culex* spp. (11 pools); *Aedes* spp. (13 pools); *Haemagogus* spp. (7 pools) and other unidentified genera. Dengue virus (DENV) sequences were amplified from 2/13 (15.38%) pools of *Aedes* spp. and a Mayaro virus (MAYV) sequence 1/7 (7.7%) were amplified from pools of *Haemagogus* spp. Phylogenetic analyzes showed that one of the DENV sequences clustered in the DENV1 and DENV2 clade. The MAYV sequence was grouped together with sequences from samples of human MAYV infections of the L group. Conclusion: These results reinforce the circulation of DENV, which causes annual outbreaks of acute febrile illnesses in the municipality, and detection, for the first time in the region, the circulation of MAYV, reinforcing the need for constant viral monitoring in this region.

KEYWORDS: Dengue; Mayaro; Arbovirus; Culicidae.

**DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS Y ALPHAVIRUS EN MOSQUITOS
(DIPTERA: CULICIDAE) CAPTURADOS EN UNA REGIÓN CERCANA A
TRES LAGOAS – MS**

RESUMEN: Introducción: Los arbovirus causan enfermedades humanas, y los cambios ecológicos y el mayor contacto humano-vector aumentan la posibilidad de brotes. Objetivo: Detectar, identificar y caracterizar arbovirus presentes en mosquitos vectores capturados en regiones de selva próximas a Tres Lagoas, MS. Metodología: Los mosquitos fueron capturados utilizando trampas de luz en las regiones forestales que rodean Tres Lagoas. Los mosquitos capturados fueron clasificados por género (clave morfológica) y agrupados en pools de hasta 20 ejemplares, y utilizados mediante la reacción RT-PCR con posterior secuenciación y análisis filogenético. Resultados: Se capturaron 851 de los géneros: *Culex* spp. (11 pools); *Aedes* spp. (13 pools); *Haemagogus* spp. (7 pools) y otros géneros no identificados. Las secuencias del virus del dengue (DENV) se amplificaron a partir de 2/13 (15,38 %) grupos de *Aedes* spp. y una secuencia de virus Mayaro (MAYV) 1/7 (7,7%) de pools de *Haemagogus* spp. Los análisis filogenéticos mostraron que una de las secuencias de DENV se agrupaba en el clado DENV1 y DENV2. La secuencia de MAYV se agrupó con secuencias de muestras de infecciones humanas de MAYV del grupo L. Conclusión: Estos resultados refuerzan la circulación de DENV, causante de brotes anuales de enfermedades febriles agudas en el municipio, y la detección, por primera vez en la región, la circulación de MAYV, reforzando la necesidad de un monitoreo viral constante en esta región.

PALABRAS CLAVE: Dengue; Mayaró; arbovirus; Culicidae.

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses, causadas por vírus que são transmitidos por artrópodes, são amplamente distribuídas, principalmente áreas tropicais, sendo mantidas na natureza por ciclos epidemiológicos envolvendo hospedeiros vertebrados e artrópodes hematófagos vetores. Estes artrópodes hematófagos podem ser mosquitos (fêmeas), principalmente os da família *Culicidae*, carrapatos e flebotomíneos, que durante a hematofagia realizada em aves, primatas, humanos e outros mamíferos, podem ser contaminados por arbovírus. São três famílias e quatro gêneros de vírus de importância médica, sendo estes pertencentes as famílias: *Flaviviridae* (Flavivirus), *Togaviridae* (Alphavirus) e *Bunyaviridae* (Orthobunyavirus e Flebovírus) (BICHAUD *et al.*, 2014; DIAGNE *et al.*, 2020).

Após a infecção ocorrida no processo de repasto sanguíneo, ocorre um período de incubação de 8 a 14 dias, onde estes vírus podem replicar-se em porções do intestino médio dos mosquitos e estabelecer posteriormente uma infecção persistente ao longo da vida, com replicação dos vírus principalmente nas glândulas salivares destes vetores (FORRESTER; COFFEY; WEAVER, 2014). A capacidade vetorial está relacionada a diferentes fatores genéticos que combinados, determinam a capacidade destes mosquitos invertebrados de transmitir estes vírus (BEERNTSEN; JAMES; CHRISTENSEN, 2000). Outras formas de infecção, menos frequentes, são as transmissões transovarianas e venéreas, já comprovadas no caso de vírus da Dengue, e hipotetizada para outros arbovírus (COFFEY *et al.*, 2013).

No Brasil, muitos arbovírus da família *Flaviviridae* já foram detectados causando tanto infecções em humanos, como circulando em espécies de mosquitos vetores, sendo os mais importantes os vírus da Dengue (DENV), nos seus quatro sorotipos, o vírus da Febre Amarela (YFV), o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus Ilhéus (ILHV), o vírus Rocio (ROCV), o Vírus Bussuquara (BSQV), o Vírus Cacipacoré (CPCV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus Zika (ZIKV) (FIGUEIREDO, 2000; BATISTA *et al.*, 2011). Estudos da circulação de flavivírus no país, tem evidenciado que estes vírus podem ser encontrados também infectando aves, roedores, cavalos, e outros animais (RODRIGUES *et al.*, 2010; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2014, SILVA *et al.*, 2014).

Além dos arbovírus da família *Flaviviridae*, também tem sido encontrado arbovírus pertencentes a família *Togaviridae*, gênero Alphavirus, causando infecções humanas, infecções em animais e circulando em mosquitos vetores de arbovírus. Entre os Alphavirus de importância clínica temos os vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV),

os vírus da Encefalite Equina do Oeste (EEWV), os vírus da Encefalite Equina Venezuelana (EEVV), os vírus Mayaro (MAYV) e os vírus Chikungunya (CHIKV) (MOURÃO *et al.*, 2012; ZUCHI *et al.*, 2014).

Entre os mosquitos vetores de arboviroses, destacam-se os mosquitos dos gêneros *Culex* spp., *Aedes* spp., *Haemagogus* spp., *Anopheles* spp. e *Sabethes* spp. (FIGUEIREDO, 2000; COFFEY *et al.*, 2013). Estudos sugerem que mudanças ecológicas contínuas (desmatamento e plantações de monoculturas) e fragmentação de ecossistemas naturais sejam os responsáveis pelo aumento do contato humano com estes vetores. Além disso, aliado aos problemas ecológicos, a adaptação de muitos destes vetores ao ambiente urbano, principalmente dos gêneros *Aedes* spp. e *Culex* spp., tem aumentado significativamente a possibilidade de surtos e/ou epidemias emergentes e re-emergentes de arboviroses (FERRO *et al.*, 2015).

Embora estudos concentrados na detecção de arbovírus em populações de mosquitos selvagens no Brasil têm sido realizados, principalmente nas regiões sudeste e norte do país, estudos deste tipo em outras regiões do país ainda são relativamente escassos. Ressalta-se que estudos de monitoramento ou vigilância viral, envolvendo tanto o estudo entomológico do vetor, como os vírus por estes transmitidos são ferramentas importantes a criação de estratégias de intervenção para controlar e prevenir surtos e epidemias. Atualmente, as medidas de controle são focadas principalmente no controle de mosquitos *Aedes* spp., principalmente nas áreas urbanas, como mecanismo de controle de DENV, CHIKV e ZIKV, entretanto outras espécies de mosquitos vetores tem grande potencial de transmissão de arboviroses, e podem estar sendo negligenciados (CARDOSO *et al.*, 2010; BARA; CLARK; REMOLD, 2013).

O Brasil possui características geográficas, climáticas e ecológicas que fornecem condições para a manutenção e reprodução de mosquitos, tornando as arboviroses um grave problema de saúde pública. Nesse sentido, observamos por exemplo, que entre os anos de 2010 e 2019 mais de 11 milhões de casos de DENV foram registrados no país, incluindo mais de 5.000 mortes (STOLERMAN; MAIA; KUTZ, 2019; BRASIL, 2022). No estado do Mato Grosso do Sul (MS) foram notificados mais de 10 mil casos de Dengue em 2021, com um aumento de mais de 150% em 2022. Três Lagoas - MS, destaca-se dentro do estado com o 3º lugar no ranking o número de casos, sendo que essas altas incidências podem estar associadas a características geográficas, climáticas e ecológicas apropriadas à reprodução e manutenção do vetor (BRASIL, 2022).

É sabido que estes vírus transmitidos por artrópodes, continuam sendo ameaças à

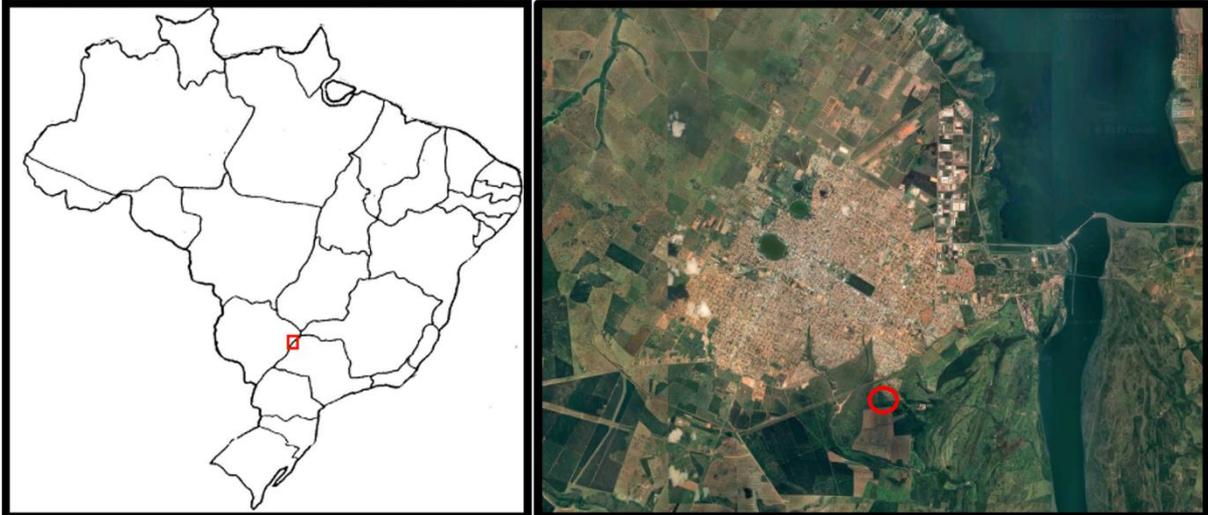
saúde pública em áreas tropicais e subtropicais, onde aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas podem estar expostas a infecção, sendo que o vetor *Aedes* spp., vem tornando-se cada vez mais adaptado ao ambiente urbano e periurbano, estimulado por convergências de fatores ecológicos, econômicos e sociais. O monitoramento de arbovírus emergentes e reemergentes com potencial epidêmico e pandêmico propicia tanto conhecimento teórico sobre suas áreas de circulação, frequência e potencial epidêmico/pandêmico como possibilita a tomada de atitudes práticas para o controle de riscos, medidas de prevenção e controle de vetores. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar arbovírus detectados em espécies de *Culicidae* capturados em regiões de mata próxima a Três Lagoas. Vale destacar, que as regiões próximas ao município sofreram forte desmatamento, para implementação de fábricas de celulose e plantação de eucalipto, e que estas pequenas regiões de mata nativa, presentes podem abrigar uma variedade de mosquitos que podem ter migrado para essas regiões devido a essa fragmentação de seus ecossistemas naturais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção de amostras de invertebrados

Armadilhas para insetos adultos foram instaladas em área de mata preservada localizada nas imediações do município de Três Lagoas (20°49'22.6" S 51°40'42.6" O) (Figura 1). As capturas foram realizadas durante 15 dias, no mês de março de 2022, onde as armadilhas eram instaladas no meio da tarde de um dia e os mosquitos capturados eram coletados na manhã do dia seguinte.

Figura 1. Localização do Município de Três Lagoas -MS e da região de captura dos mosquitos vetores.



Fonte: Os autores, 2023

As armadilhas utilizadas foram do modelo CDC light trap, utilizando CO₂ (a partir de amostras de gelo seco); luz artificial e água, como iscas para a captura dos mosquitos. Os mosquitos coletados foram identificados sobre mesa refrigerada, utilizando chaves taxonômicas para identificação das espécies e sexagem (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Foram separados mosquitos pertencentes aos gêneros: *Aedes* spp., *Culex* spp. e *Haemagogus* spp., sendo que os mosquitos capturados e pertencentes a outros gêneros e espécies foram agrupados e não processados. Posteriormente, mosquitos da mesma espécie e sexo foram agrupados e acondicionados em tubos de polipropileno, contendo até 20 espécimes por tubo, sendo armazenados a -20°C, para posterior utilização em testes moleculares.

Os *pools* de mosquitos adultos já identificados e armazenados a -20°C foram macerados em 800 µl de tampão PBS (pH 7,2) usando gral e pistilo estéreis. Após a completa maceração dos mesmos, todo o conteúdo foi transferido para um tubo de polipropileno e centrifugado a 1000 RPM por 2 minutos, para remoção das carcaças dos vetores. O sobrenadante foi aliquoteado em dois tubos contendo 140 µl cada (para extração de RNA e testes moleculares) e um tubo contendo 520 µl (para análises posteriores). As carcaças dos vetores foram armazenadas a -80 °C para posterior caracterização molecular da espécie.

2.2 Análises Moleculares

O RNA viral foi obtido a partir de 140 µl de macerado de mosquitos, utilizando o Qiamp Viral RNA Kit (Qiageninc, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As alíquotas de RNA viral foram armazenadas a -70°C para realização dos testes moleculares.

O RNA viral, extraído foi submetido a detecção molecular, sendo primeiramente realizada uma reação para detecção dos gêneros Alphavirus e Flavivirus, seguindo protocolo descrito por Bronzoni (2005). Para isto, foi realizada uma reação de transcrição reversa (RT), utiliza *primers* reversos gênero-específicos ($15\ \mu\text{M}$) e ciclagem de 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos, com posterior realização de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando conjuntos de *primers* gênero-específico ($15\ \mu\text{M}$) (BRONZONI et al., 2005), com ciclagem de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos.

Para identificação das espécies de Flavivirus presentes nas amostras consideradas positivas para o gênero Flavivirus, foi realizada uma Multiplex-*Nested*-PCR para, sendo semelhante a reação descrita anteriormente, utilizando os *primers* de espécie-específicos para cada um dos vírus: vírus Dengue (DENV) (Sorotipos: DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4), vírus da Febre Amarela (YFV), vírus da Encefalite de Saint Louis (SLV), vírus Rocio (ROCV), vírus Ilhéus (ILHV) e vírus West Nile (WNV) (BRONZONI et al., 2005).

Para identificação das espécies de Alphavirus presentes nas amostras consideradas positivas para o gênero Alphavirus, foram realizadas uma nova Multiplex-*Nested*-PCR utilizando o *primer* reverso gênero-específico ($100\ \mu\text{M}$) e *primers* espécie-específicos para cada um dos vírus: vírus Mayaro (MAYV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV) ($15\ \mu\text{M}$ cada) (BRONZONI et al., 2005) e ciclagem igual a descrita nas reações anteriores.

Os produtos de todas as PCRs realizadas a partir de RNA viral obtido das amostras, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (peso/volume), com coloração de brometo de etídio, para se observar os *amplicons* à luz ultravioleta.

2.3 Sequenciamento nucleotídico e análises filogenética das amostras

Apesar da determinação da espécie do vírus encontrado ser determinado pela própria reação de Multiplex-*Nested* – PCR, os *amplicons* obtidos na amplificação do gênero viral (1000 nt para o gênero Flavivírus e 434 nt para o gênero Alphavírus) foram sequenciados pelo método dideoxinucleotídico (SANGER et al., 1997). O sequenciamento foi realizado utilizando o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (Applied Biosystems), segundo

recomendações do fabricante e aplicados ao sequenciador automático *ABI 3130 Genetic Analyzer*, *Applied Biosystem*.

Inicialmente as sequências nucleotídicas foram analisadas usando os programas DS Gene 2.0 (Alcerys, USA) e o BLAST (*Basic Local Aligning Search Toll*) disponível no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As sequências para comparação foram obtidas a partir do banco de dados GenBank (NCBI), sendo escolhidas as sequências disponíveis que contemplasse a região analisada. A análise filogenética foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). Foram utilizadas 500 replicatas para determinação da porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de *bootstrap* são mostrados ao lado dos ramos (FALSES-TEIN, 1985). A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 42 sequências de nucleotídeos nas amostras de Alpha-virus e 52 sequências nucleotídicas nas amostras de Flavivirus. As posições de códon incluídas foram 1^o+2^o+3^o+Não codificante. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. As análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3. RESULTADOS

Foram coletados, no período, 1.569 espécimes de *Culicidae* adultos incluindo 698 (44,49%) machos e 871 (55,51%) fêmeas. Através da caracterização morfométrica foi possível diferenciar as fêmeas em quatro grupos determinados pelos gêneros aos quais estas pertenciam, sendo estes: 254 do gênero *Aedes* spp., 218 do gênero *Culex* spp. e 126 do gênero *Haemagogus* spp., e 273 fêmeas pertencentes a outros gêneros não identificados. Dessa forma, foram formados 13 *pools* de *Aedes* spp. (18 a 20 mosquitos por *pool*), 11 *pools* de *Culex* spp. (18 a 20 mosquitos por *pool*), e 7 *pools* de *Haemagogus* spp. (18 mosquitos por *pool*) (**Tabela 1**). Ressalta-se que como apenas as fêmeas são hematófagas somente *pools* de fêmeas foram testadas para arbovírus. Ainda, fêmeas coletadas e não classificadas (273 fêmeas) nos 3 gêneros acima, não foram processadas e foram armazenadas para estudos futuros.

Espécies pertencentes ao gênero *Aedes* spp. foram mais abundantes (29,17%), seguida pelos gêneros *Culex* spp. (25,03%) e *Haemagogus* spp. (14,46%). Ainda, 31,34%

dos mosquitos (fêmeas), correspondentes a outros gêneros não foram classificadas. Foram detectados 2 *pools* (2/13 – 15,4%) de fêmeas de *Aedes* spp. adultas positivas para o gênero Flavivirus que posteriormente, na reação de Multiplex-*nested-PCR* para determinação de espécies, mostraram ser DENV1 e DENV2. O sequenciamento nucleotídico seguido de análise da sequência nucleotídica da amostra de DENV1 – Três Lagoas – MS, por BLAST-N (NCBI), mostrou 99% de similaridade, do fragmento amplificado e analisado, com o vírus DENV1 (KF672759.1), linhagem americana/africana, obtida a partir de amostras de sangue humano em 2010 no Rio de Janeiro – RJ. Já a análise da sequência nucleotídica da amostra de DENV2 – Três Lagoas – MS, por BLAST-N (NCBI), mostrou 100% de similaridade, do fragmento amplificado, com vírus DENV2 (KP188556.1), linhagem asiática/americana isolado a partir de amostras de sangue humana, entre 2006 e 2014, na região de São José do Rio Preto, SP.

Tabela 1. Número, classificação de gênero e quantidades de *pools* de mosquitos capturados.

Armadilhas	Mosquitos capturados					
	<i>Aedes</i> spp.		<i>Culex</i> spp.		<i>Haemagogus</i> spp.	
	Fêmeas capturadas	Número de <i>Pools</i>	Fêmeas capturadas	Número de <i>Pools</i>	Fêmeas capturadas	Número de <i>Pools</i>
1	31		22		15	
2	24		18		17	
3	36		27		13	
4	31		29		11	
5	25		21		9	
6	18	13 <i>pools</i>	15	11 <i>pools</i>	12	7 <i>pools</i> com
7	29	com 18 a 20	19	com 18 a 20	9	18
8	21	mosquitos	22	mosquitos	16	mosquitos
9	16	cada.	20	cada.	11	cada.
10	23		25		13	

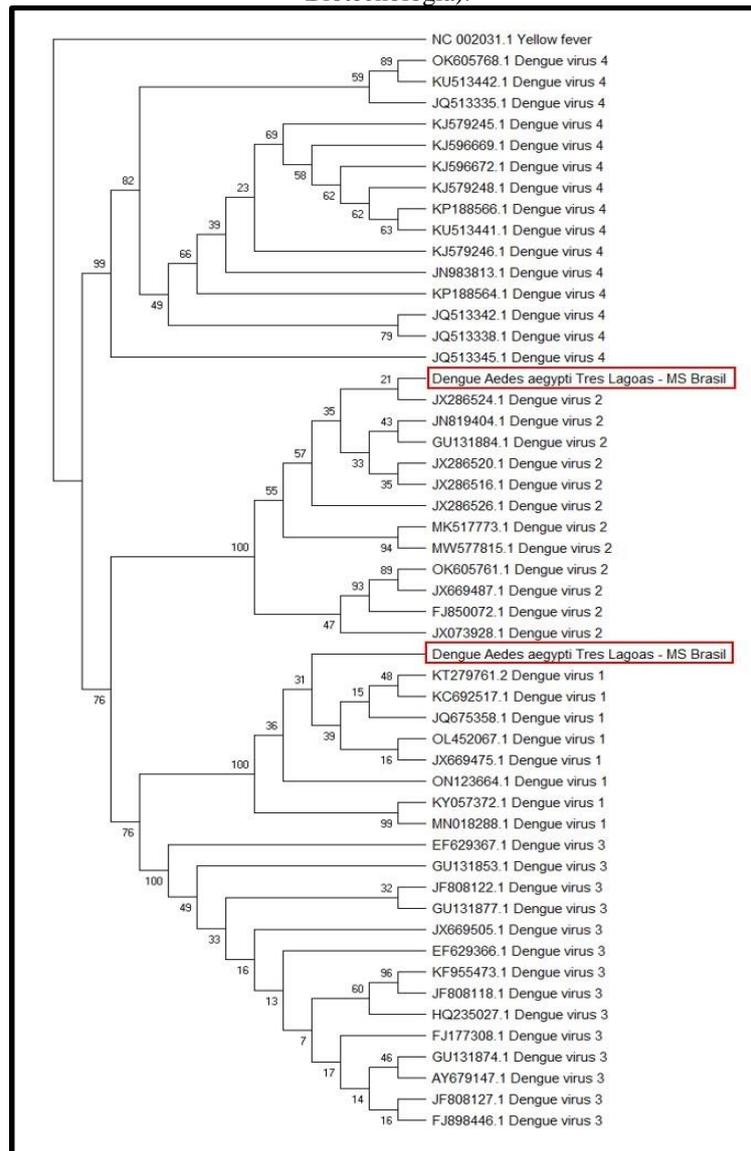
Fonte: Autores, 2023.

Análises filogenéticas do fragmento de 1000 nt sequenciado, confirmou seu agrupamento dentro dos sorotipos de DENV1 e DENV2, com alta similaridade a vírus detectados na em regiões do interior do estado de São Paulo, Rio de Janeiro e do estado do Pará (**Figura 2**).

A detecção do gênero Alphavirus foi somente possível em 1 *pool* fêmeas adultas do gênero *Haemagogus* spp. (1/7 – 14,3%) que após a realização da Multiplex-*nested-PCR* para determinação de espécie mostrou ser o MAYV. Análise da sequência nucleotídica da amostra de MAYV – Três Lagoas – MS, por BLAST-N (NCBI), mostrou 98% de similaridade, do fragmento amplificado e analisado, com o vírus MAYV (MK837006.1), obtida a partir de amostras de sangue humano em 2014 no Haiti.

Análises filogenética das sequências parciais de MAYV (434 nt) obtidas a partir de um *pool* de *Haemagogus* spp. revelaram uma semelhança com sequências do vírus obtidas de amostras humanas na região do Haiti, Guiana Francesa e Venezuela (**Figura 3**).

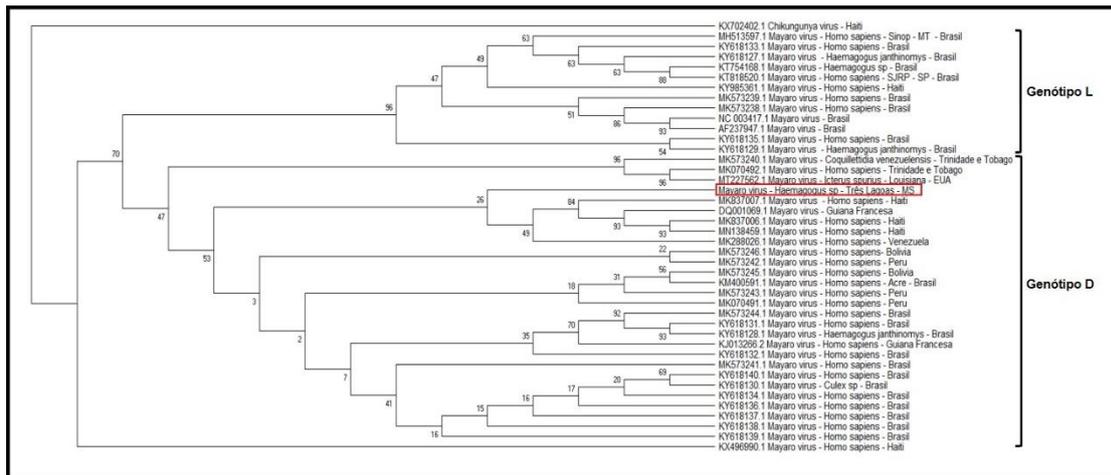
Figura 2. Análise filogenética das sequências dos vírus Dengue (DENV) a partir de *amplicons* de 1000 pb identificadas em *Aedes* spp. capturados em região de mata próxima a Três Lagoas – MS, em comparação com sequências de referência obtidas através do GenBank (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia).



A análise utilizou o método de *Neighbor-Joining* com porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de *bootstrap* (500 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 52 sequências de nucleotídeos. O vírus da Febre Amarela (YFV) foi utilizado como *Outgroup*.

Fonte: Autores, 2023.

Figura 3. Análise filogenética da sequência do vírus Mayaro (MAYV) a partir de *amplicon* de 434 pb identificadas em *Haemagogus* spp. capturados em região de mata próxima a Três Lagoas – MS, em comparação com sequências de referência obtidas através do GenBank (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia).



A análise utilizou o método de *Neighbor-Joining* com porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de *bootstrap* (500 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 42 sequências de nucleotídeos. O vírus Chikungunya (CHIKV) foi utilizado como *Outgroup*.

Fonte: Autores, 2023.

4. DISCUSSÃO

Este estudo realizado em Três Lagoas – MS, é o primeiro estudo inicial com o propósito de investigar a diversidade de espécies de *Culicidae* e a frequência de infecção destes por arbovírus dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*.

Apesar de ser exaustivamente documentada a alta densidade de *Aedes* spp. e *Culex* spp. no município de Três Lagoas – MS (SOUZA *et al.*, 2020), a circulação de mosquitos do gênero *Haemagogus* spp., tem sido pouco documentada no município.

Nos últimos anos, o município de Três Lagoas vem apresentando uma hiperendemicidade do DENV e circulação de vírus ZIKV e CHIKV, ainda que em menor proporção. Entretanto, estudos envolvendo culicídeos adultos e outros arbovírus estavam escassos nesta área, sendo este tipo de estudo, importantes na prevenção de surtos, já que segundo Chow (1998), mosquitos infectados por arbovírus são geralmente detectados por até seis semanas antes do início de um surto. O fato que os mosquitos infectados carreguem o vírus por toda a vida, também se torna um fator epidemiológico importante, pois a detecção da circulação de certos arbovírus em amostras de mosquitos capturados, podem estar associados diretamente a possíveis contaminações humanas na área. Observamos nesta análise, que o gênero *Aedes* spp. foi o mais abundante vetor encontrado nessa área, sendo positivo para DENV-1 e DENV-2, ambos vírus de alta circulação no município de Três Lagoas (SOUZA *et al.*, 2020). Acredita-se que a prevalência destes vetores (*Aedes* spp.) possa estar relacionada ao seu sucesso competitivo para criadouros, sua adaptação no ambiente urbano e peri-urbano, sua capacidade antropofílica, sua

extrema adaptabilidade a diversas condições ambientais urbanas, a ampla distribuição no país e a disponibilidade a fontes de sangue necessários para sua reprodução, bem como a características climáticas e ambientais. Dessa forma o monitoramento da circulação e endemicidade desta espécie é importante para identificar os focos de transmissão de arboviroses no município, já que este vetor tem sido associado ao ciclo de transmissão de vários arbovírus descritos no Brasil, como YFV, ROCV, ILHV, BSQV, ZIKV e CHIKV (SCHATZMAYR, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2009, ABAD-FRANCH *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.*, 2013; VEGA-RÚA *et al.*, 2014).

Os vírus DENV-1 a DENV-4 já foram identificados previamente entre os culicídeos capturados no perímetro urbano do município de Três Lagoas (SOUZA *et al.*, 2020). A distribuição dos mosquitos coletados foi homogênea em todo o perímetro urbano do município, ainda que foi observado ligeiro aumento em regiões que apresentam características socioeconômicas desfavoráveis e condições que favorecem a proliferação de mosquitos (SOUZA *et al.*, 2020). Apesar deste estudo ter detectado somente dois sorotipos do DENV (1 e 2), contrastando a identificação feita por Souza (2020), esta circulação é um fator epidemiológico importante, já que a circulação de mais de um sorotipo DENV associado à suscetibilidade de populações aos sorotipos e densidade de *Aedes* spp. são fatores que contribuem para a ocorrência de surtos e epidemias (GUEDES, 2012). Dessa forma, estudos frequentes de monitoramento da população de vetores é essencial para estabelecer medidas adequadas de controle vetorial evitando disseminação de arbovírus.

O DENV-2 detectado no município apresentaram alto grau de semelhança com outros DENV-2 isolados e detectados em amostras humanas no estado de São Paulo (100% de identidade) sendo estes do genótipo III (americano/asiático). A proximidade do município com o estado de SP, bem como o constante ingresso de população vinda deste estado para trabalhar no município, pode explicar a circulação de vírus com homologia aos DENV desse estado. Interessantemente, o DENV-1 detectado, apresentou alto grau de identidade (99%) com DENV isolado de um caso humano no município do Rio de Janeiro, associado ao genótipo V (americano/africano).

Entre os vírus do gênero Alphavirus, o único vírus detectado foi o MAYV. Este é o primeiro relato de detecção de MAYV em amostras de mosquitos *Haemagogus* spp. em Três Lagoas – MS, não sendo descritos casos humanos de infecção por MAYV no município até o presente momento. Devido à similaridade clínica entre as arboviroses, principalmente com a causada pelos vírus DENV e CHIKV, possíveis casos de MAYV

humanas podem estar sendo negligenciadas ou enquadradas erroneamente como casos de DENV, assim como observado em outras regiões (ZUCHI *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2015; GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020; AGUILAR-LUIS *et al.*, 2021; CAICEDO *et al.*, 2021).

Semelhante a outros arbovírus, o MAYV ocorre em regiões de climas tropicais, como regiões norte e nordeste do Brasil, mas exibe uma capacidade de se espalhar em um preocupante ritmo por toda a América Latina (DIAGNE *et al.*, 2020). No Brasil o MAYV é endêmico principalmente na região Amazônica, onde é mantido em ciclos silvestres envolvendo *Haemagogus janthinomys* como principal vetor e aves e primatas como hospedeiros e a infecção humana ocorre principalmente devido a exposição ocupacional (PINHEIRO; LEDUC, 1998). Entretanto, em 2012 e 2014, pesquisadores propuseram um ciclo de transmissão urbana do MAYV, observados no município de Manaus - AM e Cuiabá – MT (MOURÃO *et al.*, 2012; ZUCHI *et al.*, 2014).

Estudos tem demonstrado que diferentes espécies de *Culicidae*, podem ser vetores do MAYV como *Aedes* spp., *Culex* spp., *Psorophora* spp., *Sabethes* spp. e *Haemagogus* spp., e, nos últimos anos, a competência vetorial de transmissão do vírus em *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* já foi demonstrada experimentalmente (LONG *et al.*, 2011; ABAD-FRANCH *et al.*, 2012). A distribuição geográfica bem como os hábitos urbanos e antropomórficos destes vetores possibilitam a urbanização e transmissão do MAYV, causando surtos e epidemias, que quando não monitoradas podem ser confundidas com outras arboviroses e passarem despercebidas na avaliação epidemiológica.

A sequência nucleotídica de MAYV obtida a partir de mosquitos *Haemagogus* spp. mostrou alta identidade (98%) com sequências de vírus obtidos de amostras humanas no Haiti (MK837007.1; MK837007.1; MN138459.1), Guiana Francesa (DQ001069.1) e Venezuela (MK288026.1). Interessantemente, esta sequência de MAYV também mostrou alta identidade (95%), com MAYV isolado de caso humano em Sinop (MH513597.1); Cuiabá (KJ879256.1; KJ879257.1) e na cidade de Várzea Grande (KJ879258.1), no Mato Grosso. Vale destacar que os pacientes positivos para o MAYV em Cuiabá (2012) eram residentes urbanos e não haviam visitado áreas rurais ou silvestres, corroborando às evidências de circulação urbana desses vírus nesse município.

A árvore filogenética da sequência de MAYV detectado no município frente a sequências disponíveis no Genbank (NCBI), mostrou que o vírus detectado em *Haemagogus* spp., apresenta estreita proximidade com sequências obtidas de amostras

humanas e agrupa-se em um grande clado com outras sequências de MAYV provenientes tanto de amostras humanas como de *Haemagogus janthinomys* e *Culex* spp. detectadas no Brasil, Peru, Haiti, Guiana Francesa, Bolívia e Venezuela. Vale destacar que, apesar das sequências nucleotídicas dos genes das proteínas estruturais E2/E1 serem mais apropriados para a realização de análises filogenéticas, a utilização de sequências nucleotídicas do gene da proteína não estrutural P1 (nsP1), utilizado neste estudo, tem se mostrado eficiente no estudo das relações filogenéticas (RIBEIRO-FILHO; COIMBRA; CASSAGO, 2021; CAICEDO *et al.*, 2021). Interessantemente, a sequência nucleotídica de MAYV agrupou-se dentro do aglomerado compreendendo o genótipo D, que é composto de vários isolados da América do Sul. Já o genótipo L compreende cepas principalmente das regiões norte e central do Brasil (VIEIRA *et al.*, 2015).

É importante destacar a detecção de um número significativo de mosquitos do gênero *Haemagogus* spp., durante o período de captura, nesta região periurbana do município já que sabidamente, este gênero de mosquitos são transmissores de vírus da Febre Amarela (YFV) (ABREU *et al.*, 2018; CELONE *et al.*, 2021), e, apesar de não ter sido detectado o vírus nos espécimes avaliados, a presença do vetor gera a necessidade de constante monitoramento viral, para detecção de possível circulação deste importante arbovírus.

Fêmeas do gênero *Culex* spp. foram o segundo gênero mais frequentemente capturado, 218/871 (25,03%) e apesar de não haver sido detectados arbovírus em amostras provenientes destes mosquitos, eles possuem grande potencial de transmissão viral principalmente de vírus como SLV; ROCV; MAYV; EEEV; WEEV; VEEV e vírus Oropouche (OROV – família *Bunyaviridae*). Desta forma, um constante monitoramento destes mosquitos vetores é de suma importância na tentativa de antecipar possíveis surtos e epidemias causadas por estes vírus (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Três Lagoas, devido ao crescimento demográfico descontrolado e regiões com condições sanitárias precárias, aliado ao alto grau de desmatamento para cultivo de eucalipto, com manutenção de áreas de preservação permanente (áreas com matas nativas protegidos por lei) em regiões circunvizinhas ao município permitem à amplificação de vários arbovírus (em aves e primatas destas áreas de preservação). Entretanto, com a migração destes vetores para o perímetro urbano e periurbano, onde encontram facilidade de adaptação, é tornam-se um grave problema epidemiológico. Dessa forma, conhecer a diversidade das espécies de culicídeos, bem como, se estes estão infectados ou não por arbovírus, e quais destes vírus circulam nesses mosquitos é de suma importância na

tentativa de controlar sua introdução urbana e prevenir surtos e epidemias. Assim, faz-se necessário estudos que aprofundem o conhecimento sobre a epidemiologia, ciclo e evolução molecular desses vírus no município, como bem como melhorar as medidas de vigilância entomológica e viral.

5. CONCLUSÕES

O monitoramento da circulação viral, é uma importante ferramenta epidemiológica, que permite entender e mensurar a magnitude de uma epidemia, a dispersão dos vírus e detectar a circulação de outros vírus, os quais podem estar sendo encobertos pela circulação de vírus causadores de doenças com sintomatologias semelhantes. Desta forma, uma abordagem multidirecionada pode tornar-se um instrumento no estudo epidemiológico, sendo capaz de coletar e monitorar dados espaciais, sociais, ecológicos, virológicos, sorológicos e epidemiológicos, os quais quando combinados podem possibilitar um melhor entendimento da dispersão destes vírus, permitindo a criação de medidas de controle, principalmente de seus vetores.

Três Lagoas, por sua posição próxima ao estado de São Paulo, pode ser um ponto de convergência entre diversos municípios e um dispersor/receptor de vírus, oriundos de indivíduos que transitam temporariamente pela cidade para fazer negócios, turismo ou transporte de mercadorias. Frente a este panorama, é importante ressaltar a vigilância viral em cidades de médio porte, como Três Lagoas, que é endêmica para dengue, já que em cidades próximas no estado de São Paulo, registraram-se casos de outras arboviroses, as quais foram mascaradas pela epidemia de dengue sendo que, casos negativos de dengue, porém com sintomatologia característica, podem ser causados pela infecção por outros arbovírus.

No presente trabalho foi possível confirmar a circulação de DENV entre mosquitos do gênero *Aedes* spp. presentes em abundância na região avaliada, bem como caracterizar e determinar que estes pertencem aos sorotipos DENV1 e DENV2, sendo estes sorotipos os possíveis causadores dos numerosos casos de Dengue que o município enfrenta todos os anos. Interessantemente, e por primeira vez no município, foi detectada a circulação de um outro arbovírus, o MAYV, em mosquitos do gênero *Haemagogus* spp. Apesar de não haver relatos de pacientes infectados pelo vírus no município, a detecção da circulação do vírus, acende um alerta de que possíveis casos humanos possam estar sendo mascarados pelos casos de Dengue na região (especialmente de casos não confirmados laboratorialmente). Análises moleculares do MAYV evidenciaram que este

agrupa-se no genótipo D, que é encontrado em diferentes países, como Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana Francesa e Haiti. Contudo, algumas limitações do trabalho podem ser consideradas, sendo estas: a captura em somente uma região, o que dificulta a comparação da magnitude de captura de mosquitos vetores de arbovírus e a impossibilidade do sequenciamento completo dos DENV1, DENV2 e MAYV, o que permitiria uma melhor caracterização molecular dos vírus circulantes. Trabalhos futuros poderão abordar estas perspectivas na tentativa de um monitoramento de vetores e vírus em mais regiões do município, bem como o isolamento viral e o sequenciamento nucleotídico do genoma completo dos vírus detectados, com posterior caracterização molecular dos achados.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo acesso aos laboratórios e materiais necessários para o desenvolvimento do estudo.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. *et al.* Mayaro virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.

ABREU, F. V. S. *et al.* *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018, **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n.1, p. 218-231, 2019.

AGUILAR-LUIS, M. A. *et al.* A silent public health threat: emergence of Mayaro virus and co-infection with Dengue in Peru. **BMC Res. Notes**, v. 14, n. 29, 2021.

BARA, J. J.; CLARK T. M.; REMOLD, S. K. Susceptibility of larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to dengue virus. **J. Med. Entomol.**, v. 50, p. 179-184, 2013.

BATISTA, W. C. *et al.* Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the state of Rondônia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p. 528-530, 2011.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 115-137, 2000.

BICHAUD, L. *et al.* Arthropods as a source of new RNA viruses. **Microb. Pathog.**, v.77, p. 136-141, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 10 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n. 10, 2022.

BRONZONI, R. V. M. *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 696-702, 2005.

CAICEDO, E-Y. *et al.* The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 15, n. 6, p. e0009418, 2021.

CARDOSO, J. C. *et al.* Novos registros e potencial epidemiológico de algumas espécies de mosquitos (Diptera, Culicidae) no estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 552-556, 2010.

CELONE, M. *et al.* An ecological niche model to predict the geographic distribution of *Haemagogus janthinomys*, Dyar, 1921 a yellow fever and Mayaro virus vector, in South America. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 16, n. 7, p. e0010564, 2022.

CHOW, V. T. K. *et al.* Monitoring of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 578-586, 1998.

COFFEY, L. L. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol.**, v. 8, p. 155-176, 2013.

DIAGNE, C. T. *et al.* Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. **Pathogens**, v. 9, p. 738, 2020.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERRO, C. *et al.* Do some conditions contribute to the reemergence of the Venezuelan equine encephalitis virus in the Colombian Alta Guajira? **Biomédica**, v. 35, n. 1, p. 62-72, 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FORRESTER, N. L.; COFFEY, L. L.; WEAVER, S. C. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. **Viruses**, v. 6, p. 3991-4004, 2014.

GANJIAN, N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Ver. Panam. Salud Publica**, v. 44, p. e14, 2020.

GUEDES, D. R. D. **Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**, 2012. 101 f. Tese - Centro de Pesquisas Ageu Magalhães-Fiocruz, Recife, 2012.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LONG, K. C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 750-757, 2011.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiológicas dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

MOURÃO, M. P. G. *et al.* Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 12, p. 42-46, 2012.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

RIBEIRO-FILHO, H. V.; COIMBRA, L. D.; CASSAGO, A. Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. **Nat Commun**, v. 12, p. 3038, 2021.

RODRIGUES, S. G. *et al.* Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon Region and in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, p. 81-86, 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHATZMAYR, H. G. Viroses emergentes e reemergentes. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 209-213, 2001.

SILVA, J. R. *et al.* A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.47, p. 414-417, 2014.

SIMÕES, T. C. *et al.* Modeling the non-stationary climate dependent temporal dynamics of *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e64773, 2013.

SOUZA, R. F., *et al.* Detection all four serotypes of Dengue virus in *Aedes aegypti* mosquitoes captures in Tres Lagoas – MS, Brazil. **Int. J. Develop. Res.**, v.10, n. 19, p. 40483-40488, 2020.

STOLERMAN, L. M.; MAIA, P. D.; KUTZ, J. N. Forecasting dengue fever in Brazil: An assessment of climate conditions. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220106, 2019.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **PNAS (USA)**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TEIXEIRA, M.G. *et al.* Dengue twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.

VEGA-RÚA, A. *et al.* High vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor of the spread of Chikungunya. **J. Virol.**, v. 88, n. 11, p. 6294-306, 2014.

VIEIRA, C. J. S. P. *et al.* Detection of Mayaro virus infection during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Trop.**, v. 147, p. 12-16, 2015.

ZUCHI, N. *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, central-west Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 820-823, 2014.