

Relatório de Pesquisa

Validação do método REACT- Rapid Emerging Arbovirus Characterization Technology e desenvolvimento de painel de identificação de arbovírus por sequenciamento de nova geração

Aluna Pós-doutorado: Nathália Mayumi Noda Nicolau

Supervisora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Docente/pesquisador do programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Botucatu

2024

SUMÁRIO

1. Resumo.....	01
2. Introdução.....	02
3. Objetivo geral.....	04
4. Material e Métodos.....	05
5. Resultados.....	12
6. Discussão.....	14
7. Referências Bibliográficas.....	16
8. Atividades desenvolvidas pelo Pós-doutorando.....	20
9. Comentários do Supervisor	24

1. Resumo

Introdução: Os arbovírus são vírus de RNA relacionados a doenças que podem acometer tanto seres humanos quanto animais, e são transmitidos por artrópodes. Estudos recentes relatam a introdução e emergência (ou reemergência) de arbovírus no Brasil e no mundo que podem afetar a saúde humana e animal, e podem estar associados a fatores ambientais, como umidade, temperatura, os quais favorecem o aumento da população de mosquitos, aumentando o potencial de disseminação dos arbovírus. Assim, o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico e identificação de arbovírus podem auxiliar na vigilância epidemiológica e, consequentemente, na prevenção de novos surtos. **Objetivo:** Este estudo visa realizar a validação de uma metodologia de detecção de 6 diferentes arbovírus através da RT-qPCR.

Metodologia: Todos os mosquitos foram coletados no Rio de Janeiro e fotografados em posição anatômica lateral, as asas foram retiradas e armazenadas em lâminas para observação das características anatômicas e morfológicas de importância taxonômica. A extração de RNA e DNA foi realizada utilizando beads SPRI no aparelho de extração automatizado (DNA and RNA Extrator, Locus). Foram utilizados primers da literatura para os 6 gêneros de interesse, porém, adicionando os adaptadores Illumina nas extremidades, com intuito de já deixar essas amostras encaminhadas para o sequenciamento. Foi feita a utilização de parâmetros positivos na análise de detecção dos gêneros virais selecionados. A reação foi realizada com 4 µL de amostra e controle positivo previamente padronizado usando o kit GoTaq 1-Step RT-qPCR System da Promega conforme manual de instruções, a RT-qPCR foi realizada no aparelho QuastStudio3. As amostras de mosquitos que apresentaram positividade para a detecção de algum dos arbovírus seguiram para confirmação por sequenciamento NGS em uma flow cell Nano no aparelho MiSeq da Illumina. **Resultados:** Foram coletados na cidade do Rio de Janeiro 343 mosquitos em quatro diferentes parques ecológicos: Parque Chico Mendes, Parque Laje, Campo de Santana e Quinta da Boa Vista. Após a extração de DNA e RNA, foi realizada a análise por RT-qPCR para os 6 diferentes gêneros virais, nos quais pudemos observar que 225 mosquitos (65.6% dos mosquitos coletados) não estavam infectados por nenhuma das arboviroses investigadas, 117 foram positivos para *Flavivirus* (34% dos mosquitos coletados) e 1 mosquito positivo para *Nairovirus* (0.3% dos mosquitos coletados). Somente essas amostras positivas seguiram para sequenciamento Illumina, o qual teve um número de bases sequenciadas que passaram pelo filtro de 437.08 Mbp, com porcentagem dessas bases com uma pontuação de qualidade de 30 ou mais (%Q≥ 30) de 65.98%, e porcentagem de clusters passando pela filtragem (%PF) de 92.47%.

Discussão: Nossos resultados corroboram em parte com os dados das principais arboviroses na região, uma vez que mostraram uma maior prevalência de vírus do gênero *Flavivirus* nos mosquitos coletados, os quais causam dengue, febre amarela e Zika. Não há evidências documentadas de transmissão local de *Nairovirus* no Rio de Janeiro, porém, tivemos a detecção desse vírus em um mosquito coletado. O controle vetorial, embora seja o método de escolha no combate às arboviroses, é difícil de ser realizado devido à alta taxa de reprodução dos mosquitos e sua grande capacidade de adaptação, por isso, é de extrema importância o monitoramento e identificação dos arbovírus circulantes em uma região

2. Introdução

As doenças infecciosas são um grande problema de saúde pública global e segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 700.000 mortes por doenças infecciosas são relacionadas a doenças transmitidas por vetores(1). Além disso, estima-se que a transmissão por vetores está associada com cerca de um terço das doenças infecciosas emergentes(1). Entre estas doenças estão as arboviroses, que são doenças virais e podem acometer tanto seres humanos quanto animais, sendo transmitidos por artrópodes, como por exemplo mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Mansonia*(2). Os arbovírus (arthropod-borne virus) são vírus de RNA com mais de 500 espécies descritas, onde aproximadamente 150 espécies estão relacionadas a doenças, pertencentes a cinco famílias virais, Flaviviridae, Togaviridae, Reoviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae (3,4).

A família Flaviviridae é composta por vírus de RNA de fita simples, dividida em três gêneros, Flavivirus, Pestivirus e Hepacivirus. Entre os flavivírus, mais de 30 espécies são associadas a encefalites e febres hemorrágicas em humanos e animais, destacando-se o vírus da dengue (DENV1-4)(5), Zika vírus (ZKV)(6), vírus da febre amarela (YFV)(7), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)(8), vírus da encefalite japonesa (JEV)(8) e vírus do Oeste do Nilo (WNV)(8,9).

Por outro lado, Togaviridae é uma pequena família composta por vírus de RNA de fita simples. Anteriormente possuía dois gêneros, Alphavirus e Rubivirus, porém recentemente este último passou a pertencer à família Matonaviridae(10). O gênero Alphavirus tem diversas espécies associadas a doenças em seres humanos e animais, destacando-se o vírus da Chikungunya (CHKV)(9), vírus Mayaro (MAYV)(11) e vírus associados a encefalites equinas (EE), como o vírus da EE do leste (EEE), EE do oeste (WEE) e a EE venezuelana (VEE)(9,12,13).

A família Reoviridae é a maior família de vírus de dsRNA, dividido em 15 gêneros apresentam o genoma composto de 9, 10, 11 ou 12 segmentos. Os vírus do gênero Orthoreovirus e Orbivirus causam doenças em animais de interesse econômico, como aves, equinos e bovinos, como por exemplo o vírus da língua azul (BTV)(14).

A família Bunyaviridae é composta por vírus de fita simples de RNA negativa que se dividem em quatro gêneros que promovem infecção em animais: Orthobunyavirus, Phlebovirus, Nairovirus e Hantavirus, Dentre os principais estão o vírus da febre de Rift Valley (RVFV)(15), o vírus Oropouche (OROV)(16), e os vírus de maior causa de encefalites no grupo de encefalites da Califórnia como o vírus da encefalite Californiana, o vírus La Crosse, o vírus Jamestown Canyon e o vírus Tahyna(9).

Os vírus da família Rhabdoviridae, são vírus de RNA fita simples negativa que podem infectar humanos e animais(17,18). Entre eles, o vírus da estomatite vesicular (VSV) é considerado um arbovírus e acomete principalmente animais como bovinos, equinos e suínos, sendo transmitido pelo flebotomíneo *Lutzomyia shannoni*(19).

Entre as arboviroses, a dengue constitui um grande problema de saúde pública no Brasil. Segundo dados apresentados pelo Ministério da Saúde, o país registrou 1.544.987 casos de dengue em 2019, o que corresponde a um aumento de 488% em relação ao ano anterior. Em 2020, foram notificados 987.173 casos prováveis de dengue, porém essa diminuição pode estar associada a pandemia de COVID-19, como mobilização das equipes de vigilância epidemiológica para o enfrentamento da pandemia e o receio da população em procurar atendimento nas unidades básicas de saúde, o que pode ter levado a uma subnotificação (20).

Adicionalmente, estudos recentes relatam a introdução e emergência (ou reemergência) de arbovírus no Brasil e no mundo que podem afetar a saúde humana e animal(21,22), que podem estar associados a fatores ambientais, como umidade,

temperatura, os quais favorecem o aumento da população de mosquitos, aumentando o potencial de disseminação dos arbovírus(23–25).

Desta forma, o monitoramento de arbovírus endêmicos como DENV, ZIKV, YFV, entre outros e a identificação e caracterização de novas espécies ou espécies emergentes é de extrema importância para a saúde pública e para a economia global, devido a seu potencial de rápida disseminação, uma vez que os vetores destes vírus, como por exemplo, o mosquito *Aedes aegypti*, possuem um alto grau de adaptação e podem se reproduzir rapidamente(24), aumentando a probabilidade de infecções em um curto período de tempo, como ocorreu com o surto epidêmico de ZKV que ocorreu no Brasil entre 2014 e 2015, que além dos quadros clínicos já conhecidos, como febre baixa, erupções cutâneas, dor de cabeça, dor nas articulações, dor muscular, mal-estar geral, está associada a síndrome de Guillain-Barré e a malformações do sistema nervoso central ao nascimento, incluindo microcefalia(26).

Assim, o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico e identificação de arbovírus podem auxiliar na vigilância epidemiológica e, consequentemente, na prevenção de novos surtos.

3. Objetivo Geral

Este estudo visa realizar a validação de uma metodologia de detecção simultânea de diferentes arbovírus através de RT-qPCR multiplex, utilizando painel desenvolvido pelos colaboradores da Kansas State University. Adicionalmente, será desenvolvido um painel para o sequenciamento do genoma viral para identificação de arbovírus, que poderá auxiliar na vigilância epidemiológica de arbovírus emergentes e reemergentes de interesse de saúde humana e animal.

3.1. Objetivos Específicos

- Padronizar e identificar os 4 diferentes gêneros de arbovírus (Flavivírus, Aplyhavírus, Bunyavírus e Orbivírus) presentes nos mosquitos coletados via PCR multiplex.
- Padronizar e identificar os mosquitos positivos para arbovírus de acordo com com seus respectivos gêneros (*Aedes sp*, *Culex sp.* e *Anopheles sp*) via PCR multiplex.
- Desenvolver um painel para o sequenciamento do genoma viral com o objetivo de identificar os diferentes arbovírus de interesse de saúde pública e associados a zoonoses, por meio de sequenciamento de nova geração (NGS).
- Identificar as espécies de arbovírus detectados nos mosquitos coletados na pesquisa utilizando o painel para sequenciamento de nova geração (NGS) desenvolvido durante o projeto.

4. Material e Métodos

4.1. Coleta de mosquitos

As coletas de mosquitos foram realizadas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Primeiramente, investigamos a presença de mosquitos visitando quatro parques municipais (áreas verdes de remanescentes de Mata Atlântica ao redor de locais urbanizados), em diferentes partes da cidade: Parque Campo de Santana (região central), Parque Lage (região sul), Parque Quinta da Boa Vista (regiões norte) e Parque Chico Mendes (região oeste). Em dois desses locais, Parque Campo de Santana e Parque Quinta da Boa Vista, foi observada uma alta incidência de mosquitos,

provavelmente devido à presença de criadouros transitórios, como recipientes plásticos e latas. Ambos os parques são muito arborizados e com grande circulação de pessoas.

Os mosquitos foram coletados com um aspirador elétrico e os sacos de coleta foram cuidadosamente transportados para o laboratório. Em seguida, os mosquitos foram separados dos demais insetos, identificados e armazenados em freezer a -80°C até o processamento. Embora o aspirador seja um método eficiente para coletar mosquitos, animais indesejáveis, como aranhas, também ficaram presos no saco de coleta, prejudicando e matando a maioria dos mosquitos antes da separação no laboratório. Por isso, num segundo momento, passamos a utilizar armadilhas CDC iscadas com gelo seco instaladas em árvores por pelo menos quatro horas. Em seguida, para a realização da primeira triagem dos mosquitos, o saco de coleta foi incubado em gelo seco por aproximadamente 2 minutos e 10-15 mosquitos com características macroscópicas semelhantes foram armazenados em frascos em gelo seco até o armazenamento em freezer a -80°C .

A segunda rodada de coletas foi realizada em áreas não urbanizadas. O primeiro local foi o bairro Amaral em Nova Iguaçu, Brasil, que está localizado entre as áreas rurais e urbanas desta cidade e com alta incidência de mosquitos. A primeira coleta foi realizada durante o dia, porém, apenas alguns mosquitos foram capturados. Em seguida, foram realizadas coletas no final da tarde/noite, das 16h às 10h. Para isso, as armadilhas foram instaladas no quintal de uma casa com várias árvores e uma porção de Mata Atlântica preservada, localizada próxima a um local de criação de gado. Também observamos pequenos animais, como primatas e marsupiais, no entorno do local de coleta. A segunda área de coleta foi realizada na Mata Atlântica da Tijuca em dois locais distintos: local A (22.956547, -43.264528) e local B (-22.956241, -43.227960). Ambos os locais possuem cachoeiras, animais silvestres e grande circulação de pessoas. Foram realizadas duas coletas no sítio A (uma durante o dia e outra durante a noite), e uma coleta à tarde no sítio B.

4.2 Identificação morfológica dos mosquitos individuais

Cada mosquito coletado foi fotografado em posição anatômica lateral, e as asas de cada mosquito foram retiradas e armazenadas em lâminas para observação, tendo em conta as características anatômicas e morfológicas de importância taxonômica.

4.3 Extração de DNA e RNA total

A extração de RNA e DNA foi realizada utilizando reagentes desenvolvidos internamente pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas UNESP- Botucatu, com um protocolo desenvolvido internamente para extração automatizada utilizando o “DNA and RNA Extrator - EXTRACTA 96” (Loccus). Essa estratégia é muito importante para a padronização de extrações mais homogêneas, já que a detecção de material viral em mosquitos coletados individualmente é bastante baixa e pode variar entre cada mosquito coletado.

Os mosquitos foram homogeneizados no aparelho Precellys 24 (Bertin Technologies) utilizando 200µL de tampão de lise com 2 esferas de vidro (5mm) durante 20 seg a 6000 rpm por 2 vezes. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços para a extração utilizando beads SPRI no aparelho de extração automatizado (DNA and RNA Extrator - EXTRACTA 96, Loccus), o DNA e o RNA foram eluídos em 60µL de água ultrapura e armazenados a -80°C.

4.4 Detecção de arbovírus nos mosquitos por RT-qPCR

O desenvolvimento do painel proposto, que seria realizado pelos colaboradores da Kansas State University, não foi possível de ser realizado. Dessa forma, seguimos com uma pesquisa na literatura, na qual encontramos um trabalho anterior realizado por Villinger e colaboradores no Quênia em 2017(27), que descreveu primers funcionais

para a detecção dos gêneros virais *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Thogotovirus* (Tabela 1). Adicionalmente, como controles positivos, foram utilizados templates (oligos de cadeia dupla), representando os amplicons gerados a partir do anelamento destes primers utilizando genomas de referência (Figura 1, Tabela 2).

Tabela 1. Os primers descritos por Villinger e colegas, publicados na revista *Molecular Ecology Resources* (2017) para a detecção de arbovírus de importância médica e veterinária.

Genus	Primer names	Primer sequence
<i>Phlebovirus</i>	Phlebo JV3a F	5'-AGTTTGCTTATCAAGGGTTTGATGC-3'
	Phlebo JV3b F	5'-GAGTTTGCTTATCAAGGGTTTGACC-3'
	Phlebo JV3 R	5'-CCGGCAAAGCTGGGGTGCAT-3'
<i>Nairovirus</i>	Nairo L 1a F	5'-TCTCAAAGATATCAATCCCCCITTACCC-3'
	Nairo L 1b F	5'-TCTCAAAGACATCAATCCCCCTTWCC-3'
	Nairo L 1a R	5'-CTATRCTGTGRTAGAAGCAGTTCCATC-3'
	Nairo L 1b R	5'-GCAATACTATGATAAAACAATTMCCATCAC-3'
	Nairo L 1c R	5'-CAATGCTGTGRTARAARCAAGTTGCCATC-3'
	Nairo L 1d R	5'-GCAATGCTATGGTAGAAACAGTTTCCATC-3'
	Nairo L 1e R	5'-CRAKGTGTGGTAAAAGCAGTTTCCATC-3'
Bunyamwera group	Bunya group F	5'-CTGCTAACACCAGCAGTACTTTTGAC-3'
<i>Orthobunyavirus</i>	Bunya group R	5'-TGGAGGGTAAGACCATCGTCAGGAAGTGG-3'
<i>Alphavirus</i>	Vir 2052 F	5'-TGGCGCTATGATGAAATCTGGAATGTT-3'
	Vir 2052 R	5'-TACGATGTTGTCGTCGCCGATGAA-3'
<i>Flavivirus</i>	Flavi JV2a F	5'-AGYMGHGCCATHTGGTWCATGTGG-3'
	Flavi JV2b F	5'-AGCCGYGCCATHHTGGTATATGTGG-3'
	Flavi JV2c F	5'-AGYCGMGCAATHHTGGTACATGTGG-3'
	Flavi JV2d F	5'-AGTAGAGCTATATGGTACATGTGG-3'
	Flavi JV2a R	5'-GTRTCCCADCCDGC DGTTCATC-3'
	Flavi JV2b R	5'-GTRTCCCAKCCWGCTGTGTCGTC-3'
<i>Thogotovirus</i>	Thogoto S6 F	5'-GATGACAGYCCTTCTGCAGTGGTGT-3'
	Thogoto S6 R	5'-RACTTTRTTGCTGACGTTCTTGAGGAC-3'
	Dhori S5F	5'-CGAGGAAGAGCAAAGGAAAG-3'
	Dhori S5 R	5'-GTGCGCCCTCTGGGGTTT-3'

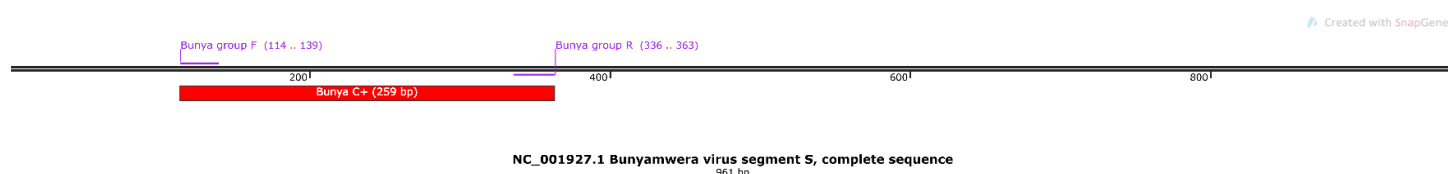


Figura 1. A figura mostra um exemplo do anelamento dos iniciadores Bunya grupo F e Bunya grupo R no segmento S do genoma do vírus *Bunyamwera*. No entanto, foi efetuado o mesmo procedimento para todos os iniciadores mencionados. Utilizando a plataforma “SnapGene”, o anelamento dos primers descritos por Villinger et al., 2017 (marcações roxas) foi realizado em diferentes genomas de referência (linha preta), resultando num amplicon (destacado a vermelho). Cada amplicon mostrado nesta imagem foi sintetizado artificialmente e será usado para a validação e padronização da detecção de arbovírus em mosquitos individuais.

Tabela 2. Os modelos de oligonucleotídeos usados como controles positivos na RT-qPCR.

Gênero	Gene alvo	Genoma de Referência	Coordenadas	Tipologia viral	Tamanho (pb)
Phlebovirus	NP (S segmento)	NC_014395	1549-1220	<i>Rift Valley fever vírus segment</i>	373
Nairovirus	RdRp (L segmento)	NC_005301	1-214	Febre hemorrágica da Crimeia-Congo	212
Orthobunyavirus	NP (S segmento)	NC_001927	114-363	<i>Bunyamwera vírus segmento S</i>	259
Alphavirus	nsP4	KC344501.1	6988-7125	<i>Encefalite equina venezuelana/Mosquito pool/MEX/MX10-95M11/2010/IE</i>	139
Flavivirus	nsP5	NC_009942	9097-9305	<i>West Nile vírus linhagem 1</i>	209
Thogotovirus	M (segmento 6)	NC_006504	486-797	<i>Thogoto vírus linhagem 6</i>	312
Thogotovirus	NP (segmento 5)	M17435	1024-1125	<i>Gene nucleoproteína de Dhorivirus, completo</i>	102

Dessa forma, optamos por utilizar esses mesmos primers descritos nesse trabalho, porém, adicionando os adaptadores Illumina nas extremidades, com intuito de já deixar essas amostras encaminhadas para o sequenciamento. Além disso, para a utilização dos templates como parâmetros positivos na análise de detecção dos gêneros virais selecionados, realizamos um ensaio de diluição seriada para obter uma concentração ideal (mimetizando a concentração encontrada nos mosquitos de campo) através de uma reação de qPCR. Para isso, primeiramente infectamos os mosquitos *Aedes aegypti*, linhagem Rockefeller, usando sobrenadante celular C636 infectado com DENV-4, e após extração do material genético, detectamos a presença viral utilizando os primers F- 5TCGGAAGCTTGCTTAACACA3 e R- 5TAACCGATGTTTGGC3 e o kit GoTaq 1-Step RT-qPCR System da Promega no aparelho QuastStudio3 (ThermoFisher) (Figura 2). Nesses mosquitos infectados o valor médio de cycle threshold (CT) obtido foi 29. Dessa forma, fizemos diversas diluições dos parâmetros positivos e selecionamos a concentração que mais se aproximava do CT encontrado nos mosquitos infectados. Estas concentrações variaram para cada modelo viral, oscilando, em média, entre 0,00010 ng/μL e $4,23 \times 10^{-7}$ ng/μL.

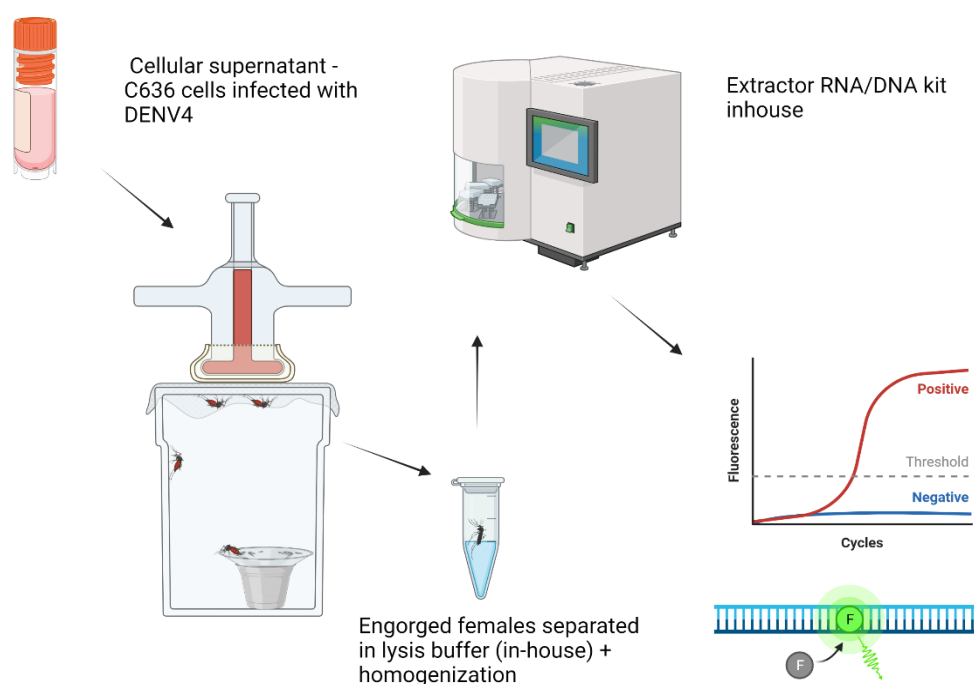


Figura 2. A figura esquemática ilustra o processo de infecção laboratorial de mosquitos *Ae. aegypti* usando sobrenadante celular C636 infectado com DENV-4, o processo de quantificação e detecção do material genético viral extraído.

Padronizamos a RT-qPCR para detectar os 6 gêneros virais usando diferentes concentrações dos primers e temperaturas de anelamento, conforme descrito na tabela 3. A reação foi realizada com 4 μ L de amostra e controle positivo previamente padronizado usando o kit GoTaq 1-Step RT-qPCR System da Promega conforme manual de instruções, a RT-qPCR foi realizada no aparelho QuastStudio3 (ThermoFisher).

Tabela 3. Descrição dos primers utilizados na RT-qPCR para cada gênero viral com suas respectivas temperaturas de anelamento e concentrações na reação.

Gênero	Nome do Primer	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração na reação (nM)
Phlebovirus	Phlebo JV3a F	59.86	500
	Phlebo JV3b F		500
	Phlebo JV3 R		500
Nairovirus	Nairo L1a F	56.2	375
	Nairo L1b F		375
	Nairo L1a R		150
	Nairo L1b R		150
	Nairo L1c R		150
	Nairo L1d R		150
	Nairo L1e R		150
Bunyamwera group Orthobunyavirus	Bunya group F	58.92	167
	Bunya group R		167
Alphavirus	Vir 2052 F	58.39	400
	Vir 2052 R		400
Flavivirus	Flavi JV2a F	58.63	200
	Flavi JV2b F		125
	Flavi JV2c F		125
	Flavi JV2d F		50
	Flavi JV2a R		400
	Flavi JV2b R		100
Thogotovirus	Thogoto S6 F	60.28	300
	Thogoto S6 R		300
	Dhori S5 F	56.51	800
	Dhori S5 R		800

4.5 Identificação de arbovírus por sequenciamento NGS

As amostras de mosquitos que apresentaram positividade para a detecção de algum dos arbovírus seguiram para confirmação por sequenciamento NGS. Considerando que essas amostras já foram amplificadas com os adaptadores Illumina, seguimos com a purificação dessas amostras por beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter) na proporção 0.9x. Posteriormente 5 µL das amostras foram indexadas usando 5µL de cada index do kit Illumina Nextera XT index setA, 25µL da enzima NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR master mix e 10µL de água ultrapura, a termociclagem foi realizada em aparelho Proflex PCR System (Applied Biosystems) e foi da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi feita a verificação da indexação das amostras em um gel de agarose 2%, no qual pudemos

observar que a indexação funcionou, porém, existiam algumas bandas inespecíficas. Dessa forma, foi realizada uma nova purificação com beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter) na proporção 0.7x com posterior verificação em gel de agarose 2%, no qual pudemos observar que as amostras agora estavam adequadas para seguir para o sequenciamento.

Sendo assim, essas amostras foram quantificadas usando o kit dsDNA HS assay (Invitrogen) e a leitura feita no aparelho Qubit. Após a quantificação, para preparação da biblioteca, cada amostra foi normalizada a 4 nM. Após o preparo da biblioteca, quantificamos esse pool em triplicata pelo Qubit novamente antes de seguir para o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado usando 8 pM da nossa biblioteca juntamente com 20% do controle PhiX a 8 pM em uma flow cell Nano no aparelho MiSeq da Illumina.

5. Resultados

5.1. Coleta e identificação morfológica dos mosquitos

Foram coletados na cidade do Rio de Janeiro 343 mosquitos em quatro diferentes parques ecológicos envoltos por regiões urbanizadas (Figura 3), são eles: Parque Chico Mendes, Parque Laje, Campo de Santana e Quinta da Boa Vista. Por conta do método de coleta por aspirador e o congelamento desses mosquitos, a maioria deles ou perdeu as asas ou então perdeu suas características anatômicas e morfológicas, o que impediu uma identificação clara pelo entomologista desses mosquitos. Dessa forma, não seguimos com a identificação morfológica e estamos trabalhando para identificar esses mosquitos molecularmente utilizando a região COI.



Figura 3. A figura mostra geograficamente os locais dos parques que foram realizadas as coletas de mosquito na cidade do Rio de Janeiro.

5.2. Detecção de arbovírus nos mosquitos

Após a extração de DNA e RNA de todos esses mosquitos foi realizada a análise por RT-qPCR para os 6 diferentes gêneros virais, nos quais pudemos observar que 225 mosquitos (65.6% dos mosquitos coletados) não estavam infectados por nenhuma das arboviroses investigadas, 117 foram positivos para *Flavivirus* (34% dos mosquitos coletados) e 1 mosquito positivo para *Nairovirus* (0.3% dos mosquitos coletados). Somente essas amostras positivas seguiram para sequenciamento Illumina, o qual teve um número de bases sequenciadas que passaram pelo filtro de 437.08 Mbp, com porcentagem dessas bases com uma pontuação de qualidade de 30 ou mais ($\%Q \geq 30$) de 65.98% (Figura 4), e porcentagem de clusters passando pela filtragem ($\%PF$) de 92.47%. As análises de todas essas sequências ainda estão em processamento, para

confirmação do resultado da RT-qPCR e para possível identificação desses vírus a nível de espécie.

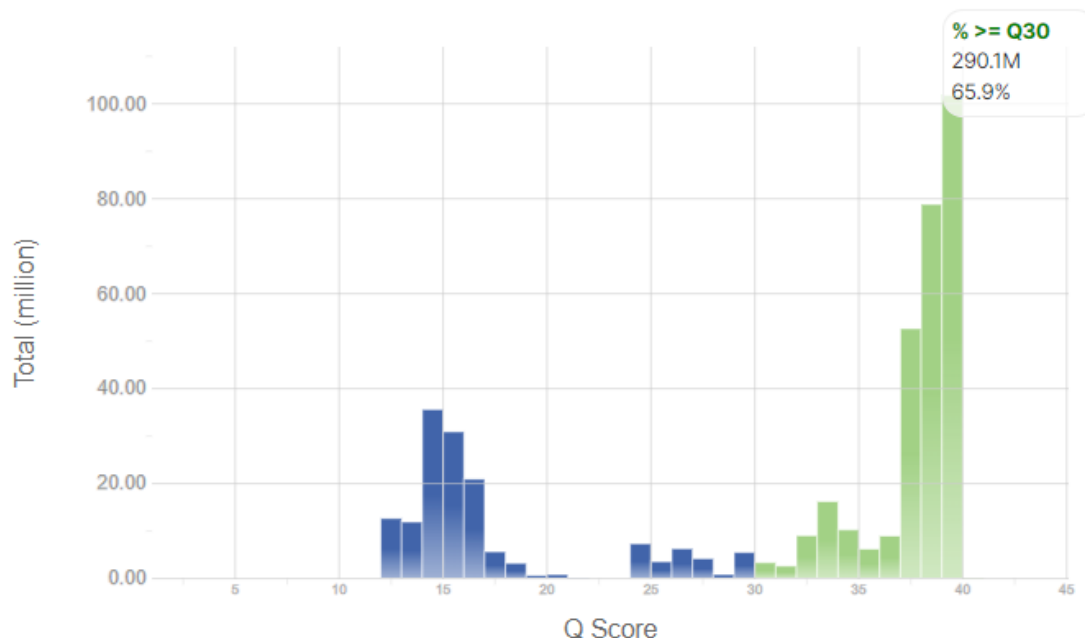


Figura 4. No gráfico de distribuição Q-score é possível verificar o número de bases por pontuação de qualidade, $\% \geq Q30$ na cor verde $\% \geq Q20$ na cor azul.

6. Discussão

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes que podem afetar humanos e animais, constituindo um grande problema de saúde pública global. Dentre as arboviroses, a dengue, febre amarela, acometem seres humanos e são considerados epidêmicos em algumas regiões, como o Brasil.

Adicionalmente, há uma crescente preocupação com os arbovírus emergentes ou reemergentes(28,29), que já causaram surtos em algumas regiões do globo, como por exemplo o surto de ZKV no Brasil entre 2014 e 2015(26); a introdução e reemergência do BTV sorotipo 8 na Europa(30) e a introdução do vírus da febre suína africana na Europa e na Ásia(31).

No Rio de Janeiro, assim como em outras regiões tropicais e subtropicais, as arboviroses são endêmicas e representam um desafio contínuo para a saúde pública. O clima tropical favorece a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor de transmissão dessas doenças, tornando o estado suscetível a surtos periódicos.

A Dengue é a arbovirose mais prevalente na região, com surtos frequentes durante os meses mais quentes e chuvosos (32). Além disso, Zika e Chikungunya também têm sido preocupações crescentes, principalmente após a epidemia de Zika em 2015-2016 (33), que teve um impacto significativo na saúde pública e levou a uma maior conscientização sobre essas doenças.

Dessa forma, nossos resultados corroboram em parte com os dados das principais arboviroses na região, uma vez que mostraram uma maior prevalência de vírus do gênero *Flavivirus* nos mosquitos coletados, os quais causam dengue, febre amarela e Zika. Porém, nenhum *Alphavirus* foi detectado nesses mosquitos, os quais possuem vírus importantes como Chikungunya. Nesse caso, pode ser que a metodologia utilizada tenha falhado em detectar os vírus, uma vez que analisamos as amostras individualmente e a quantidade de vírus presente estava abaixo do limite de detecção.

A detecção de um único mosquito positivo para *Nairovirus* (0.3% dos mosquitos coletados) indica uma prevalência muito baixa desse gênero viral na população de mosquitos estudados. A Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo (CCHF) é uma doença viral aguda grave causada pelo vírus da CCHF, pertencente ao gênero *Nairovirus*. Embora a CCHF seja endêmica em várias partes do mundo, incluindo regiões da África, Europa, Ásia e Oriente Médio, casos esporádicos ou surtos podem ocorrer em áreas onde o vetor e os reservatórios do vírus estão presentes (34). No entanto, não há evidências documentadas de transmissão local da CCHF no Rio de Janeiro, Brasil.

Portanto, apesar de ser uma baixa prevalência, não era esperado encontrar mosquitos com vírus deste gênero nesta região.

O controle vetorial, embora seja o método de escolha no combate às arboviroses, é difícil de ser realizado devido à alta taxa de reprodução dos mosquitos e sua grande capacidade de adaptação, por isso, é de extrema importância o monitoramento e identificação dos arbovírus circulantes em uma região. A identificação de arbovírus em mosquitos fornece um sistema de alerta precoce para possíveis surtos de doenças. A detecção oportuna permite que as autoridades de saúde respondam rapidamente com intervenções direcionadas, evitando o aumento de infecções e reduzindo a carga sobre os sistemas de saúde. A identificação do vírus nos mosquitos é importante para estudar os ciclos de transmissão entre eles, proporcionando melhor conhecimento dos fatores que influenciam a disseminação da doença, como espécies de mosquitos, comportamento e condições ambientais. Além disso, a detecção de arbovírus é relevante nas estratégias de controle de vetores vetoriais, pois dados precisos de detecção orientam o desenvolvimento e a implementação de estratégias eficazes de controle de mosquitos. Essas estratégias incluem a aplicação direcionada de inseticidas, agentes de controle biológico e modificação genética de mosquitos para reduzir sua capacidade de transmitir vírus.

7. Referências Bibliográficas

1. WHO. Global vector control response 2017–2030. Geneva World Heal Organ. 2017.
2. WHO. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. Vol. NO. 719, World Health Organization - Technical Report Series. 1985.
3. Karabatsos N. Supplement to International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. Am J Trop Med Hyg. 1978;27(2):372–440.

4. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:13–24.
5. Gubler DJ. Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: History and Current Status. *New Treat Strateg Dengue Other Flaviviral Dis.* 2008;277:3–22.
6. Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* [Internet]. 2018;560(7720):573–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>
7. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Jesus JG de, Aguiar RS de, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* (80-). 2018;361(6405):894–9.
8. Rust RS. Human Arboviral Encephalitis. *Semin Pediatr Neurol* [Internet]. 2012;19(3):130–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2012.03.002>
9. Beckman JD, Tyler KL. Arbovirus Infections. *Neuroinfectious Dis.* 2015;21(6):1599–611.
10. Mankertz A, Chen MH, Goldberg TL, Hübschen JM, Pfaff F, Ulrich RG. ICTV Virus Taxonomy Profile: Matonaviridae 2022. *J Gen Virol.* 2022;103(12):1–2.
11. Mourão MPG, Bastos MDS, De Figueiredo RP, Gimaque JBL, Dos Santos Galusso E, Kramer VM, et al. Mayaro fever in the city of manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2012;12(1):42–6.
12. Zacks MA, Paessler S. Encephalitic alphaviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3–4):281–6.
13. Salimi H, Cain MD, Klein RS. Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2016;13(3):514–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-016-0443-5>
14. Clavijo A, Sun F, Lester T, Jasperson DC, Wilson WC. An improved real-time polymerase chain reaction for the simultaneous detection of all serotypes of Epizootic hemorrhagic disease virus. *J Vet Diagnostic Investig.* 2010;22(4):588–93.
15. Drolet BS, Weingartl HM, Jiang J, Neufeld J, Marszal P, Lindsay R, et al. Development and evaluation of one-step rRT-PCR and immunohistochemical methods for detection of

- Rift Valley fever virus in biosafety level 2 diagnostic laboratories. *J Virol Methods* [Internet]. 2012;179(2):373–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.025>
16. Melo KFL de, Pereira CR de S, Neto WFF, Amorim MT, Ferreira JFL, Araújo APS, et al. O vírus oropouche e o seu contexto epidemiológico na america latina no período de 2009 a 2019. *Rev Eletrônica Acervo Saúde*. 2020;57:e4138.
 17. Longdon B, Murray GGR, Palmer WJ, Day JP, Parker DJ, Welch JJ, et al. The evolution, diversity, and host associations of rhabdoviruses. *Virus Evol*. 2015;1(1):1–12.
 18. Travassos Da Rosa APA, Mather TN, Takeda T, Whitehouse CA, Shope RE, Popov VL, et al. Two new rhabdoviruses (Rhabdoviridae) isolated from birds during surveillance for arboviral encephalitis, Northeastern United States. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(6):614–8.
 19. da Rocha CS, Oliveira IVP de M, Moura GHF, Bezerra JAB, Rondon FCM, Vasconcelos DC, et al. Vesicular stomatitis due to Indiana III (Alagoas/VSIV-3) is endemic in Brazilian state of Ceará. *Cienc Rural*. 2020;50(6):1–9.
 20. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Brasil. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. *Bol Epidemiológico* [Internet]. 2021;52(03):1–3121.
Girard M, Nelson CB, Picot V, Gubler DJ. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine*. 2020;38(24):3989–94.
 22. Wilson WC, Mitzel D, Savini G, Zientara S, Richt JA. Editorial: Emerging Arboviruses. *Front Vet Sci*. 2020;7:1–3.
 23. Costa EAP de A, Santos EM de M, Correia JC, de Albuquerque CMR. Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Entomol*. 2010;54(3):488–93.
 24. Brady OJ, Johansson MA, Guerra CA, Bhatt S, Golding N, Pigott DM, et al. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites and Vectors*. 2013;6(351):1–12.

25. Robert MA, Stewart-ibarra AM, Estallo EL. Climate change and viral emergence: evidence from Aedes-borne arboviruses. *Curr Opin Virol*. 2020;40:41–7.
26. Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, et al. The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1).
27. Villinger J, Mbaya MK, Ouso D, Kipanga PN, Lutomiah J, Masiga DK. Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis. *Mol Ecol Resour*. maio de 2017;17(3):466–80.
28. WHO. A global brief on vector-borne diseases. *World Heal Organ*. 2014;1–56.
29. Young PR. Arboviruses: A Family on the Move. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2018. p. 265–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1>
30. Zientara S, Sánchez-Vizcaíno JM. Control of bluetongue in Europe. *Vet Microbiol*. 2013;165(1–2):33–7.
31. Dixon LK, Stahl K, Jori F, Vial L, Pfeiffer DiU. African Swine Fever Epidemiology and Control. *Annu Rev Anim Biosci*. 2020;8:221–46.
32. Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2007;22(5):358-363.
33. de Oliveira WK, de França GVA, Carmo EH, et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *The Lancet*. 2017;390(10097):861-870. doi:10.1016/S0140-6736(17)31368-5.
34. WHO. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *World Health Organization*. January 2013.

8. Atividades realizadas no período de Pós-doutorado

Avaliador em eventos

1. Atuou como avaliador de trabalhos no evento XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, no dia 16 de Outubro de 2023.

Participação em eventos

2. VIII Workshop de Biotecnologia, organizado pelos alunos de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, realizado de 26/06/2023 a 28/06/2023, contabilizando carga horária total de 20 horas. (Anexo 1)
3. WORKSHOP INTERNACIONAL EM BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE: CAMINHOS DA INOVAÇÃO, realizado nos dias 20 e 21 de Outubro de 2023 em Botucatu, São Paulo, na qualidade de ouvinte, com carga horária de 20 horas. (Anexo 2)
4. 1º Encontro do Programa de Pós-Doutorado da Unesp realizado em 18 de Abril de 2024, na cidade de São Paulo, contabilizando carga horária total de 8 horas. (Anexo 3)

Artigo científico

5. Artigo científico de revisão intitulado "The Main Arboviruses and Virus Detection Methods in Vectors: Current Approaches and Future Perspectives", está sendo submetido na revista Pathogens.

Verifique o código de autenticidade 1160410.88917681.6.8.5301507745937537 em <https://eventos.lib.unesp.br/documentos>







CERTIFICADO

Certificamos que

Nathalia Mayumi Noda Nicolau, participou com êxito do evento VIII Workshop de Biotecnologia, organizado pelos alunos de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, realizado de 26/06/2023 a 28/06/2023, contabilizando carga horária total de 20 horas.

Botucatu, 28 de junho de 2023


Valber Pedrosa
Coordenador PPG - BTC


Valéria Sandrim
Docente responsável

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

CERTIFICADO

Certificamos que NATHÁLIA MAYUMI NODA NICOLAU participou do WORKSHOP INTERNACIONAL EM BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE: CAMINHOS DA INOVAÇÃO, realizado nos dias 20 e 21 de Outubro de 2023 em Botucatu, São Paulo, na qualidade de ouvinte, com carga horária de 20 horas.

Botucatu, 21 de Outubro de 2023.

Prof. Titular Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
Diretor da Faculdade de Medicina de Botucatu
FMB - Unesp

Prof.ª Associada Sonia Marta Moriguchi
Coordenadora do evento
FMB-Unesp

Cep: 18.618-970 - Campus da Unesp/Rubião Júnior - Botucatu/SP - Fone: (14)3880-0000

Verifique o código de autenticidade 18967675.89950903.6.8.8967675895090368 em <https://www.event3.com.br/documentos>

PROPE
PRÓ-REITORIA
DE PESQUISA

1º ENCONTRO DO PROGRAMA DE PÓS-DOUTORADO

Certificamos que **Nathália Mayumi Noda Nicolau**, participou do 1º Encontro do Programa de Pós-Doutorado da Unesp realizado em 18 de Abril de 2024, na cidade de São Paulo, contabilizando carga horária total de 8 horas.

São Paulo, 18 de Abril de 2024



Edson Cocchieri Botelho
Pró-Reitor de Pesquisa

unesp

PÓS-DOC
unesp

9. Comentários do Supervisor

Este relatório demonstra a competência e dedicação da aluna no campo da pesquisa científica. Em primeiro lugar, gostaria de destacar o interesse da aluna na profundidade e abrangência do conhecimento na área, que durante o período de pós-doutorado redigiu juntamente com colegas do laboratório uma revisão sobre as principais metodologias na detecção de arboviroses em vetores, intitulado “The Main Arboviruses and Virus Detection Methods in Vectors: Current Approaches and Future Perspectives”, o qual está sendo submetido na revista “Pathogens”. A aluna mostrou-se competente na condução de experimentos e na interpretação de resultados. Mais importante ainda, ela demonstrou um compromisso em todas as etapas do processo de pesquisa. No momento, ela está finalizando as análises do sequenciamento das amostras e posteriormente redigirá o artigo científico com esses dados. Em resumo, o relatório de pesquisa apresentado pela aluna Nathália Mayumi Noda Nicolau, reflete seu compromisso com a excelência e sua contribuição significativa para o avanço do conhecimento em sua área.