

Nathália Mayumi Noda Nicolau

**Barcoding de DNA em Mosquitos: Uso do Gene COI na Identificação de
Espécies**

**Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista
(UNESP), FMB, Botucatu/SP**

Supervisora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE
(USDA) - 58-3022-1-003-F

Botucatu

2025

SUMÁRIO

1. Resumo.....	01
2. Introdução.....	02
3. Objetivo geral.....	04
4. Material e Métodos.....	05
5. Resultados.....	09
6. Discussão.....	16
7. Referências Bibliográficas.....	18
8. Atividades desenvolvidas pelo Pós-doutorando.....	20
9. Comentários do Supervisor	21

1. Resumo

Introdução: A identificação de mosquitos é uma etapa crucial para o controle de doenças transmitidas por esses vetores, como dengue, zika, malária e febre amarela. Tradicionalmente, essa identificação tem sido feita por meio de técnicas morfológicas, em que os entomologistas analisam características físicas dos mosquitos. No entanto, a identificação molecular, particularmente através do uso do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI), tem se mostrado uma alternativa superior em muitos aspectos, uma vez que, esse gene é altamente conservado dentro das espécies, mas apresenta variações suficientes entre espécies diferentes, tornando-o ideal para distinção taxonômica. **Objetivo:** Validação de uma metodologia para identificação de mosquitos de acordo com seus respectivos gêneros (*Aedes sp*, *Culex sp*. e *Anopheles sp*) utilizando primers específicos para região do gene COI e sequenciamento de nova geração (NGS). **Metodologia:** Foi realizado o desenho de primers para região do gene COI usando o software Geneious e considerando milhares de sequências do genoma de diferentes gêneros como: *Aedes sp*, *Culex sp*. e *Anopheles sp*. Foram coletados mosquitos na cidade do Rio de Janeiro e após extração de DNA desses mosquitos, a região COI foi amplificada por RT-qPCR usando os primers desenhados já com os adaptadores Illumina, que então foram sequenciados por NGS. **Resultados:** Desenvolvemos e validamos a utilização de um ensaio de RT-qPCR usando primers de própria autoria com inclusão de adaptadores Illumina, seguido pelo sequenciamento NGS, para a identificação de mosquitos. A maioria das amostras identificadas pertenceu ao gênero *Culex*, com destaque para *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens*, espécies de relevância epidemiológica. **Discussão:** Este estudo aplicou a técnica de DNA barcoding com o gene COI para identificar espécies de mosquitos, destacando-se pela validação de primers com adaptadores Illumina incorporados. Essa abordagem inovadora otimizou o protocolo de sequenciamento, reduzindo etapas, tempo e custos experimentais. Apesar de limitações na identificação de todas as amostras, os resultados fortalecem a aplicação do barcoding molecular na vigilância de vetores.

Palavras-chave: mosquito, COI, DNA barcoding, sequenciamento

2. Introdução

A identificação de mosquitos é uma etapa crucial para o controle de doenças transmitidas por esses vetores, como dengue, zika, malária e febre amarela. Tradicionalmente, essa identificação tem sido feita por entomologistas, que por meio de técnicas morfológicas analisam as características físicas dos mosquitos. No entanto, a identificação molecular, particularmente através do uso do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI), tem se mostrado uma alternativa superior em muitos aspectos, uma vez que, esse gene é altamente conservado dentro das espécies, mas apresenta variações suficientes entre espécies diferentes, tornando-o ideal para distinção taxonômica(1,2).

O gene COI é uma região do DNA mitocondrial que codifica uma subunidade da enzima citocromo c oxidase, a qual desempenha um papel crucial na cadeia de transporte de elétrons e na produção de energia celular. Este gene tem aproximadamente 650 pares de bases de comprimento e é altamente conservado entre diferentes espécies, mas apresenta variações nucleotídicas suficientes para permitir a discriminação entre espécies(2–4).

A identificação morfológica depende da observação de características físicas, como a estrutura das escamas, forma das asas e padrões de coloração. Essas características podem ser muito semelhantes entre espécies diferentes, levando a erros de identificação (5). Por outro lado, a identificação molecular baseada no gene COI utiliza a análise de sequências de DNA, que são únicas para cada espécie. Isso proporciona uma precisão muito maior, reduzindo significativamente o risco de erros(1,2).

Além disso, a identificação morfológica é particularmente desafiadora quando se trata de larvas, pupas ou ovos, que frequentemente carecem de características distintivas visíveis e amostras adultas danificadas ou fragmentadas também podem ser

difíceis de identificar(6,7). Já a técnica de DNA barcoding, utilizando o COI, permite a identificação precisa independentemente do estágio de desenvolvimento ou do estado físico da amostra, pois pequenos fragmentos de DNA são suficientes para a análise (7,8).

A identificação morfológica é um processo que pode ser demorado e requer entomologistas altamente treinados. A identificação molecular, embora envolva etapas laboratoriais, pode ser mais rápida quando realizada em larga escala. Técnicas como a PCR e o sequenciamento de DNA permitem a análise simultânea de múltiplas amostras, aumentando a eficiência do processo.

Algumas espécies de mosquitos são crípticas, ou seja, são morfológicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintas. Essas espécies podem ter diferentes comportamentos, habitats e capacidades de transmissão de doenças. A identificação molecular é capaz de distinguir essas espécies crípticas, fornecendo informações valiosas para programas de controle e pesquisa epidemiológica (9,10).

Os dados obtidos por identificação molecular podem ser facilmente comparados com bancos de dados globais, como o Barcode of Life Data Systems (BOLD) (11). Isso permite a identificação rápida e precisa de espécies, mesmo em regiões onde a fauna local de mosquitos não é bem conhecida. Além disso, facilita a colaboração internacional e a troca de informações entre pesquisadores.

O uso do COI para a identificação de mosquitos tem sido validado em diversos estudos. Hebert et al.(1,2) foram pioneiros na proposta do DNA barcoding utilizando o COI, demonstrando sua eficácia em diversas espécies animais. Em relação aos mosquitos, Cywinska(12) mostraram que o DNA barcoding pode diferenciar com precisão várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, um dos principais vetores de arbovírus.

Estudos subsequentes continuaram a reforçar a utilidade do COI, Kumar et al.(13) utilizaram o COI para identificar diferentes espécies de mosquitos em áreas endêmicas de malária na Índia, enquanto Wang et al.(14) aplicaram a técnica para a identificação de mosquitos na China, confirmando a robustez do método em diferentes contextos geográficos e ecológicos. Mais recentemente, vários autores (15–18) exploraram a diversidade de mosquitos na América do Sul usando o DNA barcoding, contribuindo para um melhor entendimento da biodiversidade regional e das potenciais ameaças à saúde pública.

Embora a identificação morfológica continue sendo uma ferramenta importante na entomologia, a identificação molecular oferece inúmeras vantagens em termos de precisão, eficiência e aplicabilidade em diferentes contextos. O uso do gene COI para DNA barcoding tem revolucionado a forma como os mosquitos são identificados, proporcionando uma ferramenta poderosa para o monitoramento e controle de doenças transmitidas por esses vetores.

3. Objetivo Geral

Este estudo visa realizar a validação de uma metodologia para identificação de mosquitos de acordo com seus respectivos gêneros (*Aedes sp*, *Culex sp*. e *Anopheles sp*) utilizando primers específicos para região do gene COI e sequenciamento de nova geração (NGS).

3.1. Objetivos Específicos

- Desenhar primers para região do gene COI considerando o genoma de mosquitos de diferentes gêneros como: *Aedes sp*, *Culex sp*. e *Anopheles sp*.

- Amplificar a região do COI via RT-qPCR com os primers desenhados já com a inclusão dos adaptadores Illumina, para que os amplicons obtidos já estejam adequados para posterior sequenciamento e não seja necessário o uso de kit de tagmentação de amostras.
- Identificar as espécies de mosquitos coletados utilizando o sequenciamento de nova geração (NGS).

4. Material e Métodos

4.1. Coleta de mosquitos

Inicialmente, as coletas de mosquitos seriam realizadas na cidade de Botucatu, porém isso não foi possível e, portanto, nós utilizamos nesse estudo os mosquitos que foram anteriormente coletados na cidade do Rio de Janeiro (Brasil) para um outro projeto de pesquisa do nosso grupo. Esses mosquitos foram coletados em 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 Extração de DNA total

A extração de 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). 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, Locus), o DNA foi eluído em 60µL de água ultrapura e armazenado a -80°C.

4.3. Desenho de primers para região do gene COI

Os primers foram desenhados para a região do gene COI utilizando o software Geneious, com base em milhares de sequências genômicas de diferentes gêneros de mosquitos, incluindo *Aedes* sp., *Culex* sp. e *Anopheles* sp. A região-alvo escolhida corresponde a um fragmento de 735 pb do DNA mitocondrial. A partir dessa região, foram projetados os primers já contendo sequências adaptadoras para a plataforma Illumina de NGS.

4.4 Amplificação do gene COI por RT-qPCR

A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) em um dispositivo QuantStudio 3. Todos os primers desenhados foram testados usando temperaturas de anelamento diferentes (45°C, 50°C e 55°C), concentrações de primers de 400 nM, 600 nM, 800 nM e 1000 nM, além de volumes de 2 µL e 5 µL da amostra de DNA. A PCR foi conduzida com uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento com as três diferentes temperaturas descritas por 30 segundos e extensão a 60 °C por 30 segundos. Uma análise de curva de dissociação foi realizada com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, seguida por incubação a 60 °C por 1 minuto e uma etapa final a 95 °C por 1 segundo. Os resultados

foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 2%, onde observou-se amplificação em aproximadamente 450 pb.

4.5 Identificação dos mosquitos por sequenciamento de nova geração (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). Posteriormente 5 µL das amostras foram indexadas usando 5µL de cada index do kit Illumina Nextera XT index set a/set b/set c/set d, 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) 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%, para observar se a indexação funcionou e se seria necessário uma nova purificação com beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter) para que as amostras estivessem 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.

Posteriormente, foi realizada a análise das sequências amplificadas do gene COI de cada amostra. Após o sequenciamento, foi realizada a análise da qualidade dos dados, da cobertura obtida e identificação das espécies.

4.6 Análise Metagenômica Utilizando FastQC, SPAdes, Trimmomatic, Kraken2 e BLAST-BOLD

Para a análise de bioinformática, as leituras brutas de sequenciamento foram submetidas a uma avaliação inicial de qualidade utilizando o software FastQC v0.11.9 (19), com os parâmetros padrão, tanto antes quanto após o pré-processamento. A filtragem de qualidade e a remoção de adaptadores foram realizadas com o Trimmomatic v0.39 (20), em modo pareado (*paired-end*), aplicando os parâmetros: ILLUMINACLIP:NexteraPE-PE.fa:2:30:10:8, HEADCROP:15 e SLIDINGWINDOW:4:20, a fim de remover adaptadores de sequenciamento e bases de baixa qualidade. Em seguida, a montagem *de novo* dos amplicons COIA e COIB foi realizada utilizando o SPAdes v3.15.5 (21), em modo *paired-end*. Os contigs montados foram submetidos a buscas por similaridade de sequência com o BLASTn v2.13.0 (22), contra o banco de dados padrão de nucleotídeos do NCBI (23).

Adicionalmente, um script em Python desenvolvido internamente foi utilizado para consultar a plataforma BOLD (Barcode of Life Data System) (24), visando a identificação taxonômica por meio do banco de dados COX1. Análises comparativas entre as anotações obtidas pelo BLASTn e pelo BOLD foram conduzidas para avaliar a concordância entre os resultados e aprimorar a inferência taxonômica. As anotações finais foram organizadas em tabelas e utilizadas nas etapas posteriores de visualização e interpretação dos dados.

5. Resultados

5.1. Coleta dos mosquitos

Foram coletados na cidade do Rio de Janeiro 343 mosquitos em quatro diferentes parques ecológicos envoltos por regiões urbanizadas (Figura 1), são eles: Parque Chico Mendes, Parque Laje, Campo de Santana e Quinta da Boa Vista.



Fig. 1. A figura representa a localização dos quatro parques municipais (áreas verdes remanescentes da mata atlântica em locais urbanizados), em diferentes partes da cidade, para investigar a presença de mosquitos: Parque Campo de Santana (região Central), Parque Laje (região Sul), Parque Quinta da Boa Vista (região Norte) e Parque Chico Mendes (região Oeste).

5.2. Validação dos primers desenhados para região do gene COI

Inicialmente, desenhemos e testamos primers contendo adaptadores Illumina incorporados (destacados por sublinhado nas sequências), com o objetivo de amplificar a região COI selecionada dividida em três amplicons menores, com aproximadamente 250 pb cada, denominados COIA, COIB e COIC (Tabela 1). Em uma etapa posterior, desenvolvemos um novo conjunto de primers que dividiu a mesma região em apenas dois amplicons maiores, com cerca de 450 pb cada, denominados COIA e COIB (Tabela 2).

Tabela 1. Primers desenhados com adaptadores Illumina (sublinhado) dividindo a região COI em três amplicons menores (COIA, COIB e COIC)

Nome do Primer	Sequência dos primers
COIA_F	5'- <u>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</u> YAT AAT TGG GAG GAT TTG GAA A-3'
COIA_R	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTG</u> CTA AAT CAA CTG AIG CYC C-3'
COIB_F	5'- <u>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</u> TGG RGC TTC AGT TGA TTT AGC -3'
COIB_R1	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA</u> GGG TCT CCY CCT CCA ATT GG-3'
COIB_R2	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA</u> GGG TCT CCT CCT CCT GCA GG-3'
COIC_F	5'- <u>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</u> TCC AAT TGG AGG RGG AGA ICC-3'
COIC_R1	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGC</u> TCG AGT ATC AAC ATC TAT ACC W-3'
COIC_R2	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGC</u> TCG AGT ATC TAC GTC TAT ACC T-3'

Tabela 2. Primers desenhados com adaptadores Illumina (sublinhado) dividindo a região COI em dois amplicons menores (COIA e COIB)

Nome do Primer	Sequência dos primers
COIA_F	5'- <u>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</u> GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC-3'
COIA_R	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GCG</u> GTC TGT TAA TAA CAT AGT AAT AGC-3'
COIB_F	5'- <u>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</u> AGA TCG A/ideoxyl/T ACC TTT ATT-3'
COIB_R1	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA</u> GGG TCT CCY CCT CCA ATT GG-3'
COIB_R2	5'- <u>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGT</u> TCC GTG TAA AGT TGC TAA TCA ACT NAA A-3'

A reação de RT-qPCR para validação dos primers desenhados foi realizada com o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) em um equipamento QuantStudio 3. Inicialmente, testamos os primers que dividem a região COI em três

amplicons menores (COIA, COIB e COIC), variando as condições experimentais quanto à temperatura de anelamento (45 °C, 50 °C e 55 °C), concentração dos primers (400 nM, 600 nM, 800 nM e 1000 nM) e volume da amostra de DNA (2 µL e 5 µL). Os resultados mostraram que, embora os primers COIB e COIC tenham apresentado amplificação em algumas dessas condições, o primer COIA não demonstrou desempenho satisfatório, não gerando produtos detectáveis de forma consistente (Figura 2).

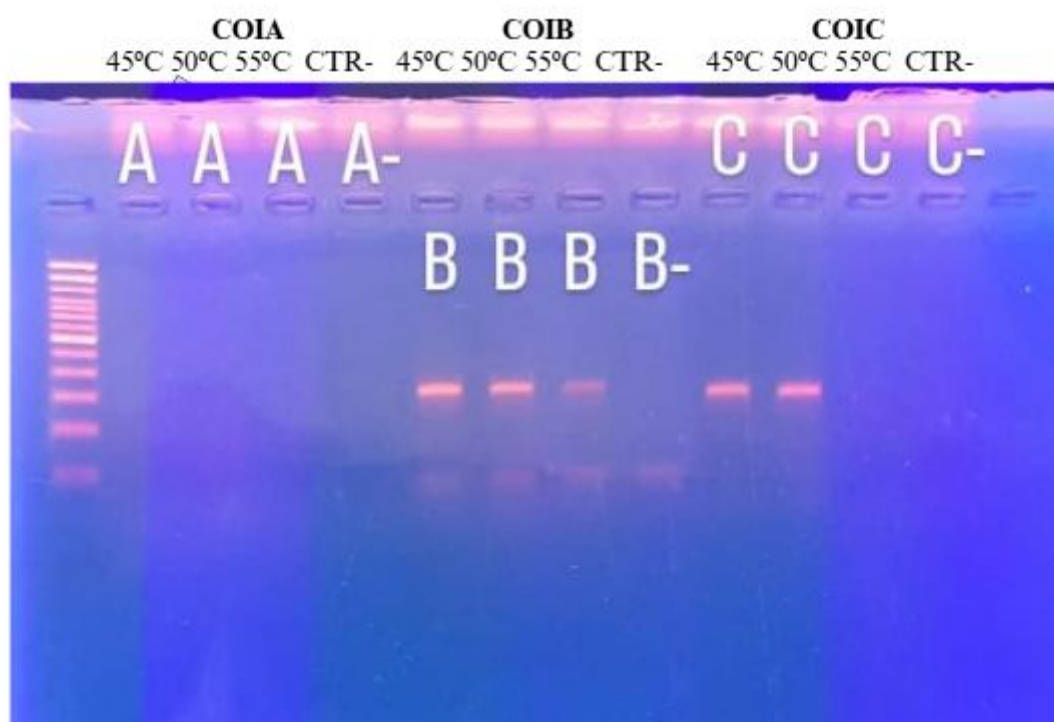


Fig. 2. A figura mostra um gel de agarose mostrando a amplificação dos primers COIA, COIB e COIC em diferentes temperaturas de anelamento, e seus controles negativos (CTR-).

Diante dos resultados insatisfatórios com a estratégia de três amplicons, passamos a testar os primers que dividem a região COI em apenas dois fragmentos (COIA e COIB), repetindo todos os testes experimentais. Após diversas tentativas, conseguimos estabelecer uma condição ideal de PCR para ambos os primers: temperatura de anelamento de 55 °C, concentração de 600 nM de primers e uso de 2 µL da amostra de DNA (Figura 3). A reação de PCR foi conduzida com uma desnaturação inicial a 95 °C

por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 60 °C por 30 segundos. Em seguida, foi realizada a análise da curva de dissociação, iniciando com desnaturação a 95 °C por 15 segundos, incubação a 60 °C por 1 minuto e um último passo de desnaturação rápida a 95 °C por 1 segundo. A amplificação dos produtos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 2%, evidenciando bandas consistentes com tamanho aproximado de 450 pb. Dessa forma, validamos com sucesso os primers descritos na Tabela 2 para as regiões COIA e COIB, viabilizando sua aplicação na identificação molecular dos mosquitos por meio de sequenciamento NGS.

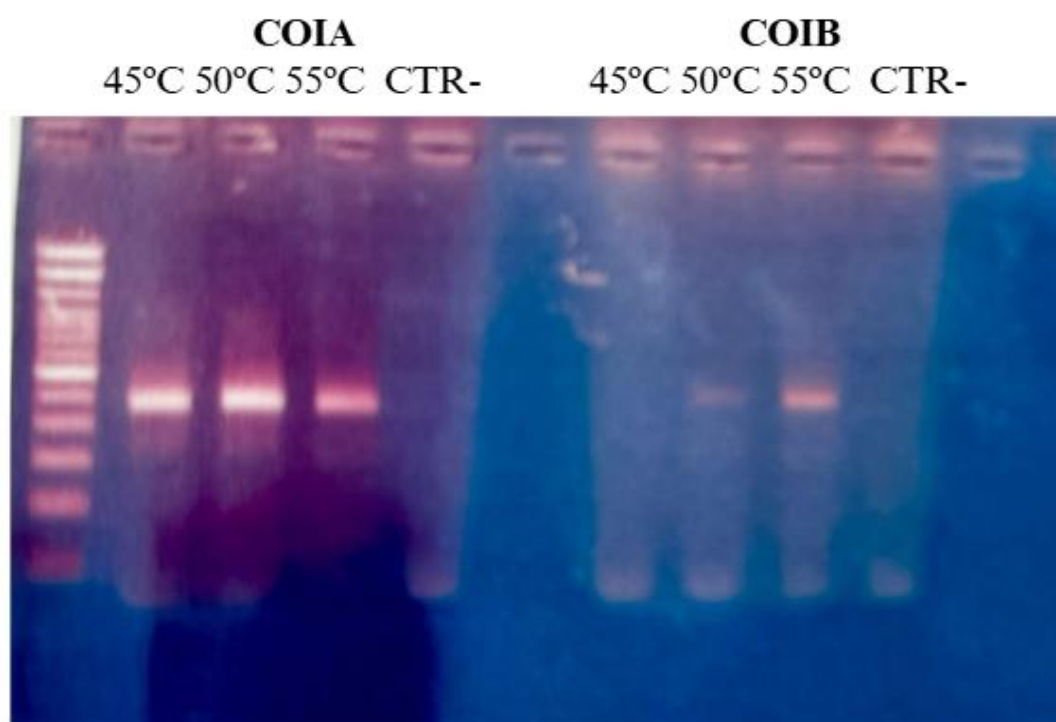


Fig. 3. A figura mostra um gel de agarose mostrando a amplificação dos primers COIA e COIB em diferentes temperaturas de anelamento, e seus controles negativos (CTR-).

5.2. Amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI para identificação de mosquitos

Conseguimos validar os primers que dividem a região COI em dois amplicons menores (COIA e COIB), otimizando a amplificação para posterior identificação molecular por sequenciamento. No entanto, nem todas as amostras de mosquitos coletadas apresentaram amplificação positiva para o gene COI. Dos 343 indivíduos analisados, apenas 270 foram amplificados com sucesso e seguiram para o sequenciamento. As quatro corridas de sequenciamento apresentaram, em média, um percentual de PF (pass filter) de 90,59%, refletindo um alto número de leituras válidas, com uma qualidade média Q30 de 70,41%, o que indica boa qualidade dos dados gerados.

Após a análise de bioinformática dos dados de sequenciamento Illumina, identificamos espécies virais em 205 dos 270 mosquitos sequenciados (Tabela 3). Nossos resultados mostraram que 42,6% dos mosquitos eram *Culex quinquefasciatus*, 30,9% *Culex pipiens*, 8,3% *Aedes albopictus*, 6,9% *Aedes scapularis*, 4,9% *Culex declarator*, 2,9% *Culex torrentium*, 2,0% *Culex bidens*, 1,0% *Culex kyotoensis* e 0,5% *Anopheles nr. costai* G4 MAMS-2018 (Figura 4).

Tabela 3. Número total e porcentagem de espécies de mosquitos coletados e identificados por NGS.

Espécie de mosquito	Total (n)	(%)
<i>Aedes albopictus</i>	17	8.3%
<i>Aedes scapularis</i>	14	6.9%
<i>Anopheles</i>	1	0.5%
<i>Culex bidens</i>	4	2.0%
<i>Culex declarator</i>	10	4.9%
<i>Culex kyotoensis</i>	2	1.0%
<i>Culex pipiens</i>	64	30.9%
<i>Culex quinquefasciatus</i>	87	42.6%
<i>Culex torrentium</i>	6	2.9%
Total	205	100%

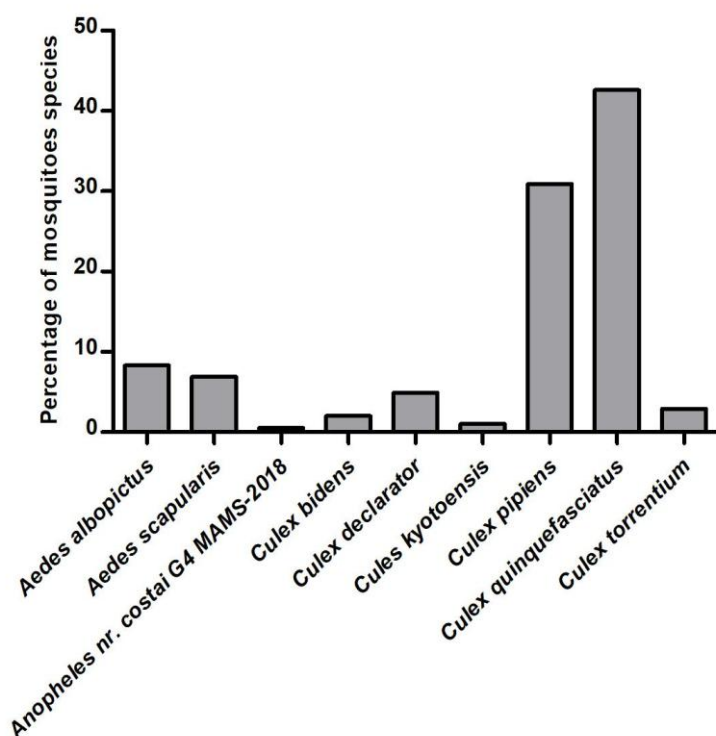


Fig. 4. Espécies de mosquitos identificadas por NGS e suas respectivas porcentagens.

6. Discussão

Este trabalho teve como objetivo explorar e aplicar a técnica de DNA barcoding, utilizando a região do gene COI, para a identificação precisa de espécies de mosquitos. A pesquisa é de grande relevância, considerando o papel desses insetos como vetores de diversas doenças de importância em saúde pública, como dengue, zika, malária e febre amarela (25). A identificação correta das espécies é fundamental para o monitoramento entomológico, a elaboração de estratégias eficazes de controle vetorial e a compreensão da dinâmica de transmissão de arboviroses e outras enfermidades.

Neste estudo, foram identificadas principalmente espécies do gênero *Culex*, com destaque para *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens*. Essas espécies possuem relevância epidemiológica por estarem associadas à transmissão de vírus como o West Nile (vírus do Nilo Ocidental) (26) e Vírus da Encefalite Japonesa (27), além de arbovírus emergentes e outros patógenos que afetam tanto humanos quanto animais (28). A

predominância dessas espécies entre os exemplares identificados reforça a necessidade de vigilância específica sobre seus hábitos e sua distribuição geográfica.

Entretanto, a identificação molecular da espécie não foi possível em todas as amostras analisadas, o que pode ser atribuído a uma combinação de fatores técnicos e biológicos. Em alguns casos, a baixa qualidade ou quantidade do DNA extraído comprometeu a amplificação da região COI, possivelmente em decorrência da degradação do material genético ou da presença de inibidores da reação de PCR (29,30). Além disso, mutações nos sítios de ligação dos primers podem ter dificultado a amplificação eficiente em determinadas espécies ou populações de mosquitos (31, 32). Soma-se a isso a limitação dos bancos de dados de referência utilizados (como NCBI e BOLD), que ainda não contemplam todas as espécies ou apresentam registros incompletos, dificultando a atribuição taxonômica precisa (32). Também devem ser considerados fatores técnicos relacionados ao preparo das bibliotecas, falhas de amplificação específicas e cobertura insuficiente durante o sequenciamento, que podem ter comprometido a geração de dados adequados para a identificação de parte das amostras (33,34).

Apesar dessas limitações, o estudo obteve avanços importantes. Conseguimos validar primers com adaptadores Illumina incorporados, o que representa uma otimização significativa do protocolo laboratorial. Essa abordagem reduz etapas no preparo das bibliotecas de sequenciamento, diminui o tempo total do experimento e gera economia de reagentes e insumos, tornando o processo mais eficiente e viável para aplicações em larga escala em programas de vigilância entomológica.

A técnica de DNA barcoding baseada no gene COI oferece várias vantagens para a identificação de espécies de mosquitos. O gene COI é altamente conservado dentro de uma mesma espécie, o que permite a comparação confiável entre populações geograficamente distintas (1,2). Ao mesmo tempo, essa região apresenta variações

nucleotídicas suficientes entre diferentes espécies, tornando-a ideal para a diferenciação, mesmo entre espécies morfologicamente semelhantes (2-4). Além disso, o uso do barcoding permite superar as limitações da identificação morfológica, especialmente útil em amostras danificadas, fragmentadas ou em estágios imaturos (larvas e pupas), nas quais a diferenciação taxonômica por características externas pode ser inviável (6,7).

Portanto, ao aplicar a técnica de DNA barcoding utilizando o gene COI, este estudo contribui de forma significativa para o aprimoramento da identificação molecular de mosquitos, fortalecendo as ferramentas disponíveis para a vigilância e o controle de vetores, e ampliando a capacidade de resposta frente a doenças transmitidas por esses insetos. Um dos principais diferenciais deste trabalho foi a validação de primers já contendo adaptadores Illumina incorporados, o que representa uma importante inovação metodológica. Essa estratégia elimina a necessidade de etapas adicionais de ligação de adaptadores durante o preparo das bibliotecas de sequenciamento, resultando em um protocolo mais ágil, com menor consumo de reagentes e, consequentemente, redução de custos. Essa otimização torna o processo mais eficiente e acessível para aplicação em estudos de larga escala em programas de vigilância entomológica e epidemiológica.

7. Referências Bibliográficas

1. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2003;270(1512):313–21.
2. Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2003;270:S96–9.
3. Folmer O., Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3(5):294–9.
4. Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2761–2.
5. Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). Smithsonian Institution. 2004. Systematic Catalog of Culicidae. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org>

6. Oliver DR. Life History of the Chironomidae. Entomol Res Inst. 1971;6008:211–30.
7. Failla AJ, Vasquez AA, Hudson P, Fujimoto M, Ram JL. Morphological identification and COI barcodes of adult flies help determine species identities of chironomid larvae (Diptera, Chironomidae). Bull Entomol Res. 2016;106(1):34–46.
8. Janzen DH, Hajibabaei M, Burns JM, Hallwachs W, Remigio E, Hebert PDN. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2005;360(1462):1835–45.
9. Rozo-Lopez P, Mengual X. Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: Identification through DNA barcoding and adult morphology. Zookeys. 2015;(513):39–64.
10. Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(41):14812–7.
11. Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. Mol Ecol Notes. 2007;7(3):355–64.
12. Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med Vet Entomol. 2006;20(4):413–24.
13. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2007;44(1):1–7.
14. Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z, et al. Identifying the Main Mosquito Species in China Based on DNA Barcoding. PLoS One. 2012;7(10):1–11.
15. Muñoz-Gamba AS, Laiton-Donato K, Perdomo-Balaguera E, Castro LR, Usme-Ciro JA, Parra-Henao G, et al. Molecular characterization of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Colombian rainforest. J Sao Paulo Inst Trop Med. 2021;63(e24):1–11.
16. Laurito M, Ayala AM, Arias-Builes DL, Almirón WR. Improving the DNA Barcode Library of Mosquito Species With New Identifications and Discoveries in North-Central Argentina. J Med Entomol. 2022;59(1):173–83.
17. Motoki MT, Linton YM, Conn JE, Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC. Phylogenetic network of mitochondrial coi gene sequences distinguishes 10 taxa within the neotropical albitarsis group (diptera: Culicidae), confirming the separate species status of *Anopheles albitarsis* h (diptera: Culicidae) and revealing a novel lineage, *Anopheles albitarsis* J. J Med Entomol. 2021;58(2):599–607.
18. Bourke BP, Conn JE, De Oliveira TMP, Chaves LSM, Bergo ES, Laporta GZ, et al. Exploring malaria vector diversity on the Amazon Frontier. Malar J [Internet]. 2018;17(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2483-2>
19. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
20. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30: 2114–2120.
21. SPAdes. (n.d.). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3342519/>
22. BLASTn. (n.d.). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
23. NCBI. RefSeq: Reference sequence database.
24. BLAST-BOLD. Barcode of Life Data Systems. 2025.

25. World Health Organization. Vector-borne diseases. Geneva: WHO; 2020 [cited 2025 Jul 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.
26. Gould CV, Staples JE, Guagliardo SAJ, Martin SW, Lyons S, Hills SL et al. West Nile Virus: A Review. JAMA. 2025.doi: 10.1001/jama.2025.8737
27. Hernández-Triana LM, Sewgobind S, Parekh I, Johnson N, Mansfield KL.Evidence of Transmission Capability in UK Culex pipiens for Japanese Encephalitis Virus (JEV) Genotype I and Potential Impact of Climate Change.Viruses. 2025;17(7):869.
28. Dachraoui K, Osman RB, Slama SB, Sayadi A, Maachach Y, Trifi M. West Nile Virus Antibody Prevalence in Horses During the 2023 Outbreak in Tunisia, North Africa. Vector Borne Zoonotic Dis. 2025. doi: 10.1177/15303667251359822.
29. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology, 113(5), 1014–1026.
30. Meusnier, I. et al. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. BMC Genomics, 9(1), 214
31. Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., & Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. Methods in Ecology and Evolution, 9(1), 134–147.
32. Clarke, L. J., Soubrier, J., Weyrich, L. S., & Cooper, A. (2014). Environmental metabarcoding: a review of the methodology and applications in ecology and conservation. Molecular Ecology, 23(24), 5879–5896.
32. Collins, R. A., & Cruickshank, R. H. (2013). The seven deadly sins of DNA barcoding. Molecular Ecology Resources, 13(6), 969–975.
33. Pentinsaari, M., Ratnasingham, S., Miller, S. E., & Hebert, P. D. N. (2020). BOLD and GenBank revisited – Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? PLoS ONE, 15(4), e0231814.
34. Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C., & Baird, D. J. (2011). Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. PLoS ONE, 6(4), e17497.

8. Atividades realizadas no período de Pós-doutorado

Participação em banca

1. Participou da banca de doutorado da aluna Nathalia Almeida Souza Tancler, no dia 22 de Outubro de 2024. (Anexo 1)

Participação em eventos

2. II WORKSHOP INTERNACIONAL EM BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE: CAMINHOS DA INOVAÇÃO, realizado nos dias 08-10 de Abril de 2025

em Botucatu, São Paulo, na qualidade de ouvinte, com carga horária de 20 horas. (Anexo 2)

3. Poster apresentado no II WORKSHOP INTERNACIONAL EM BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE: CAMINHOS DA INOVAÇÃO, realizado nos dias 08-10 de Abril de 2025 em Botucatu, São Paulo. (Anexo 3)

Artigo científico

4. Artigo científico intitulado “The Main Arboviruses and Virus Detection Methods in Vectors: Current Approaches and Future Perspectives”, foi publicado na revista *Pathogens*, 2025. (FI 3.3) (Anexo 4)

9. Comentários do Supervisor

Este relatório evidencia a dedicação, competência e seriedade da aluna no desenvolvimento de atividades de pesquisa científica. Durante o período de pós-doutorado, Nathália Mayumi Noda Nicolau demonstrou grande interesse e domínio na área de arboviroses, elaborando em parceria com colegas de laboratório, uma revisão intitulada “*The Main Arboviruses and Virus Detection Methods in Vectors: Current Approaches and Future Perspectives*”, publicada na revista *Pathogens* (FI 3.3).

A aluna destacou-se tanto na execução experimental quanto na análise crítica dos resultados obtidos, demonstrando autonomia e rigor metodológico ao longo de todo o processo investigativo. Atualmente, encontra-se em fase final de redação de um artigo científico com os dados gerados em sua pesquisa, que será submetido à revista *Plos Pathogens*, intitulado “*Molecular Detection of Arboviruses and Insect-Specific Flaviviruses in Mosquitoes from Rio de Janeiro, Brazil*”.

Em síntese, o trabalho realizado por Nathália reflete sua sólida formação acadêmica, comprometimento com a pesquisa de qualidade e sua contribuição para o avanço do conhecimento na área de vigilância entomológica e virologia ambiental.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



A T E S T A D O

Atestamos que a Profa. Dra. **NATHÁLIA MAYUMI NODA NICOLAU**, do(a) / FCA/Botucatu - Unesp, participou em 22 de outubro de 2024, como MEMBRO TITULAR da Comissão Examinadora da DEFESA DE TESE de NATHÁLIA ALMEIDA SOUZA TANCLER, discente regular do Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), Curso de Doutorado Profissional, cujo trabalho se intitula **Avaliação *in vivo* e *in vitro* da susceptibilidade de plaquetas humanas em relação à infecção do vírus SARS-CoV-2**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros:

1. Prof. Dr. ANGELO JOSÉ MAGRO (Orientador - Participação Presencial)
Depto de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp
2. Profa. Dra. CAROLINE RODRIGUES BASSO (Participação Presencial)
Faculdade Galileu de Botucatu
3. Profa. Dra. NATHÁLIA MAYUMI NODA NICOLAU (Participação Presencial)
FCA/Botucatu - Unesp
4. Profa. Dra. MICHELE JANEGITZ ACORCI VALERIO (Participação Presencial)
Universidade Paulista (UNIP)
5. Prof. Dr. LUCAS GABRIEL RIBEIRO (Participação Presencial)
Crop Labs Ltda

Botucatu, 22 de outubro de 2024.


Diego Cezário Royolim de Oliveira
Supervisor da Seção Técnica
de Pós-graduação



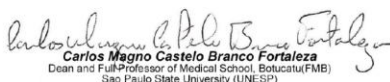
ANEXO 2

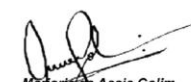


CERTIFICATE

This is to certify that
NATHÁLIA MAYUMI NODA NICOLAU
 participated in the II International Workshop on Biotechnology in Health: Paths of
 Innovation, held from April 8 to 10, 2025, in Botucatu, Sao Paulo, Brazil, as an attendee,
 totaling 16 hours.

Botucatu, April 22th, 2025.


Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
 Dean and Full Professor of Medical School, Botucatu (FMB)
 Sao Paulo State University (UNESP)


Marjorie de Assis Golim
 PhD and Professor in the Postgraduate Program in Research and Development: Medical Biotechnology
 Sao Paulo State University (UNESP), Medical School, Botucatu (FMB)

Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro Avenue, s/n - UNESP - Rubião Júnior Campus - Botucatu/SP - Zip Code: 13618-687 - Telephone: +55 14 3880-1001

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 JÚLIO DE MESQUITA FILHO - UNESP
 CÂMPUS DE BOTUCATU
 FACULDADE DE MEDICINA
 Diretoria Técnica Acadêmica

 Record number 1323
 Fls.30 Book 4
 BOTUCATU 2025 - May - 6.

PROGRAM

April 8th, 2025

- 7:00 PM - Opening Ceremony
- 8:30 PM - Opening Lecture: "National Center for Biopharmaceutical and Biomolecule Production: How to Turn your Molecule into a Product?"
- Speaker: Senior Researcher Rui Seabra Ferreira Júnior. Scientific Director of the Technology Park, Brazil
- 9:40 PM - Opening Cocktail

April 9th, 2025 (Morning)

- 9:00 – 9:50 AM - Lecture: "Dynamics of Histone Modifications in Aging"
- Speaker: Dr. Lei Gu – Max Planck Institute, Germany
- 9:50 – 10:00 AM - Q&A
- 10:00 – 10:30 AM - Poster Session and Coffee Break
- 10:30 – 11:30 AM - Scientific Abstracts Oral Presentation
- 11:30 – 12:10 PM - Lecture: "Bring Your Project to Life with SENAI Institutes".
- Speaker: Prof. Carlos Alberto P. Coelho. Director of SENAI Institute for Innovation in Biotechnology, Brazil.
- 12:10 – 12:20 PM - Q&A

April 9th, 2025 (Afternoon)

- 2:00 – 3:20 PM - Workshop: "Learn How to Structure Your Pitch to Attract Investment with UpLab SENAI".
- Speaker: Prof. Caio Henrique S. de Oliveira. Startup and Business Accelerator – SENAI, Brazil
- 3:20 – 4:00 PM - Lecture: "Biotechnology Patents: From Research to Market"
- Speaker: Dr. Carolina Mazzonato – Vilage – Trademarks and Patents, Brazil
- 4:00 – 4:30 PM - Poster Session and Coffee Break
- 4:30 – 5:20 PM - Lecture: "How to Turn Work into a Business"
- Speaker: Dr. Milena Rosa Lozano – Business Consultant - Confraria da Cura, Brazil
- 5:20 – 5:30 PM - Q&A

April 10th, 2025

- 8:00 – 8:50 AM - Roundtable: "Social and Economic Impact of Academic Research".
- Speakers: Prof. Dr. Marjorie de Assis Golim
- Prof. Dr. Rejane Maria Tommasini Grotto
- Roundtable Moderator: Prof. Dr. Ana Silvia S. Barraviera S. Ferreira
- Postgraduate Program in Research and Development: Medical Biotechnology, Brazil
- 8:50 – 9:00 AM - Q&A
- 9:00 – 9:30 AM - Poster Session and Coffee Break
- 9:30 – 11:00 AM - Roundtable: "Qualified Professional Training and the Productive Sector"
- Roundtable Moderator: Prof. Dr. Marjorie de Assis Golim
- Speakers: - Dr. Jayme Nunes - Loccus do Brasil, Brazil
- Dr. Bruna Gaelzer S. Torres – Grupo NC, Brazil
- Dr. Raquel F. Nogueira - Beckman Coulter Life Sciences, Brazil
- 11:00 – 11:15 AM - Q&A
- 11:15 AM – 12:00 PM - Awards and Closing Ceremony

ANEXO 3



CERTIFICATE

This is to certify that

scientific paper INNOVATION IN THE DETECTION OF EMERGING ARBOVIRAL INFECTIONS AND FIELD MOSQUITO CHARACTERIZATION, by the author(s) CINTRA, AMANDA MONTEZANO ; NODA NICOLAU, NATHÁLIA MAYUMI; NAZARIO DE MORAES, LEONARDO; AKEMI ASSATO, PATRÍCIA; ALMEIDA MARQUES, WILLIAM; RODRIGUES SAUDA, MATHEUS; RODRIGUES, ANA BEATRIZ; LEITE DE OLIVEIRA SO, MILENA; BAHIA NASCIMENTO, ANA CRISTINA; TARGINO VALENTE, GUILHERME; SOUZA-NETO, JAYME A.; TOMMASINI GROTO, REJANE MARIA was presented at the II International Workshop on Biotechnology in Health: Paths of Innovation, held from April 8 to 10, 2025, in Botucatu, Sao Paulo, Brazil, in the Poster category.

Botucatu, April 22th, 2025.


Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
 Dean and Full Professor of Medical School, Botucatu (FMB)
 Sao Paulo State University (UNESP)


Marjorie de Assis Golim
 PhD and Professor in the Postgraduate Program in Research and Development: Medical Biotechnology
 Sao Paulo State University (UNESP) Medical School, Botucatu (FMB)

Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro Avenue, s/n - UNESP - Rubião Júnior Campus - Botucatu/SP - Zip Code: 13618-687 - Telephone: +55 14 3880-1001

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 JÚLIO DE MESQUITA FILHO - UNESP
 CÂMPUS DE BOTUCATU
 FACULDADE DE MEDICINA
 Diretoria Técnica Acadêmica

Record number 1214
 Fls. 30 Book 4
 BOTUCATU 2025 - May - 6.

PROGRAM

April 8th, 2025

- 7:00 PM - Opening Ceremony
- 8:30 PM - Opening Lecture: "National Center for Biopharmaceutical and Biomolecule Production: How to Turn your Molecule into a Product?"
- Speaker: Senior Researcher Rui Seabra Ferreira Júnior. Scientific Director of the Technology Park, Brazil
- 9:40 PM - Opening Cocktail

April 9th, 2025 (Morning)

- 9:00 – 9:50 AM - Lecture: "Dynamics of Histone Modifications in Aging"
- Speaker: Dr. Lei Gu – Max Planck Institute, Germany
- 9:50 – 10:00 AM - Q&A
- 10:00 – 10:30 AM - Poster Session and Coffee Break
- 10:30 – 11:30 AM - Scientific Abstracts Oral Presentation
- 11:30 – 12:10 PM - Lecture: "Bring Your Project to Life with SENAI Institutes".
- Speaker: Prof. Carlos Alberto P. Coelho. Director of SENAI Institute for Innovation in Biotechnology, Brazil.
- 12:10 – 12:20 PM - Q&A

April 9th, 2025 (Afternoon)

- 2:00 – 3:20 PM - Workshop: "Learn How to Structure Your Pitch to Attract Investment with UpLab SENAI".
- Speaker: Prof. Caio Henrique S. de Oliveira. Startup and Business Accelerator – SENAI, Brazil
- 3:20 – 4:00 PM - Lecture: "Biotechnology Patents: From Research to Market"
- Speaker: Dr. Carolina Mazzocato – Vilage – Trademarks and Patents, Brazil
- 4:00 – 4:30 PM - Poster Session and Coffee Break
- 4:30 – 5:20 PM - Lecture: "How to Turn Work into a Business"
- Speaker: Dr. Milena Rosa Lozano – Business Consultant - Confraria da Cura, Brazil
- 5:20 – 5:30 PM - Q&A

April 10th, 2025

- 8:00 – 8:50 AM - Roundtable: "Social and Economic Impact of Academic Research".
- Speakers: Prof. Dr. Marjorie de Assis Golim
- Prof. Dr. Rejane Maria Tommasini Grotto
- Roundtable Moderator: Prof. Dr. Ana Sílvia S. Barraviera S. Ferreira
- Postgraduate Program in Research and Development: Medical Biotechnology, Brazil
- 8:50 – 9:00 AM - Q&A
- 9:00 – 9:30 AM - Poster Session and Coffee Break
- 9:30 – 11:00 AM - Roundtable: "Qualified Professional Training and the Productive Sector"
- Roundtable Moderator: Prof. Dr. Marjorie de Assis Golim
- Speakers: - Dr. Jayme Nunes - Loccus do Brasil, Brazil
- Dr. Bruna Gaelzer S. Torres - Grupo NC, Brazil
- Dr. Raquel F. Nogueira - Beckman Coulter Life Sciences, Brazil
- 11:00 – 11:15 AM - Q&A
- 11:15 AM – 12:00 PM - Awards and Closing Ceremony

ANEXO 4



Review

The Main Arboviruses and Virus Detection Methods in Vectors: Current Approaches and Future Perspectives

Amanda Montezano Cintra^{1,†}, Nathália Mayumi Noda-Nicolau^{1,†}, Milena Leite de Oliveira Soman¹, Pedro Henrique de Andrade Affonso¹, Guilherme Targino Valente¹ and Rejane Maria Tommasini Grotto^{1,*}

¹ São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural Sciences, Department of Bioprocesses and Biotechnology, Multiuser Central Laboratory, Botucatu, Brazil; São Paulo State University (UNESP), Institute of Biotechnology, Botucatu, Brazil.

[†] Contributed equally

* Correspondence: rejane.grotto@unesp.br

Abstract: Mosquito-borne viruses pose significant public health threats worldwide, necessitating efficient and accurate detection methods to monitor their prevalence in populations. This article provides a comprehensive review of various methodologies used to detect viruses in vectors, exploring both traditional and advanced techniques. The discussion includes serological assays, molecular methods, viral isolation, and emerging technologies, with a focus on their advantages, limitations, and potential for future research and surveillance.

Keywords: arboviruses; vectors; virus.
