



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
*Campus de Araraquara***

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia

Marília Mazzi Moraes

**Avaliação da circulação do Vírus da Encefalite de Saint
Louis (SLEV) e do Vírus Oropouche (OROV)/*Oropouche-
like* em três municípios brasileiros por reconstrução
filogenética.**

Araraquara

2019

Marília Mazzi Moraes

Avaliação da circulação do Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) e do Vírus Oropouche (OROV)/*Oropouche-like* em três municípios brasileiros por reconstrução filogenética.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestra em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mondini

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca

Araraquara

2019

M827a Moraes, Marília Mazzi.
Avaliação da circulação do Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) e do Vírus Oropouche (*OROV*)/*Oropouche-like* em três municípios brasileiros por reconstrução filogenética / Marília Mazzi Moraes. – Araraquara, 2019.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Virologia.

Orientador: Adriano Mondini. Coorientadora:
Carolina Colombelli Pacca.

1. Arbovírus. 2. SLEV. 3. OROV. 4. *OROV-like virus*. 5. Reconstrução Filogenética. I. Mondini, Adriano, orient. II. Pacca, Carolina Colombelli, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da circulação do Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) e do Vírus Oropouche (OROV)/Oropouche-like em três municípios brasileiros por reconstrução filogenética

AUTORA: MARILIA MAZZI MORAES

ORIENTADOR: ADRIANO MONDINI

COORIENTADORA: CAROLINA COLOMBELLI PACCA MAZARO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ADRIANO MONDINI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. ANA CAROLINA BERNARDES TERZIAN

Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profa. Dra. CINTIA BITTAR OLIVA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- UNESP- São José do Rio Preto

Araraquara, 21 de agosto de 2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Dedicatória

À minha família: Jane e Romero.

Agradecimentos

- ❖ Ao meu orientador Adriano, que me apresentou à virologia e acreditou no meu potencial para jogar.
- ❖ À minha coorientadora Carol, que aceitou o desafio de entrar no jogo aos 45 do segundo tempo para me auxiliar no que eu precisasse.
- ❖ Ao Prof. Maurício Nogueira e ao seu time, que me estenderam a mão quando eu mais precisei. Em especial à Gislaine, à Aninha, ao Bruno, à Karina, ao Léo, à Thaysa, à Nath, ao Rafa, à Tati e aos visitantes do Laboratório de Pesquisa em Virologia.
- ❖ À Prof^a Roberta Bronzoni e à Janaina por toda a colaboração.
- ❖ Ao Prof. Cristiano e à sua equipe, principalmente à Fernanda, pelo auxílio com os equipamentos de que sempre precisava.
- ❖ Ao Prof. Alessandro e ao Danilo, que foram peças chave no meu treinamento.
- ❖ À minha patrocinadora oficial, CAPES.
- ❖ Às Alines, à Lola, à Mari e ao Dennys, que compartilharam seus conhecimentos táticos comigo.
- ❖ Aos companheiros de time, Paulo, Tainá, Carla, Igor e Bruna, que estavam sempre prontos para tirar as minhas dúvidas.
- ❖ Ao meu parceiro de jogadas Gustavo, que dividiu comigo os pontos altos e baixos deste jogo desde o começo.
- ❖ Ao meu torcedor mais fanático (literalmente), Maurício, por me colocar para cima nos momentos de desânimo, por todo o carinho e por ser o meu refúgio.

❖ Aos meus patrocinadores não-oficiais, Jane e Romero, pelo suporte, orientação e apoio nas minhas decisões. Sem vocês, eu não poderia ter jogado.

❖ A Deus, o árbitro mais justo.

*“É preciso que eu suporte duas ou três larvas
se quiser conhecer as borboletas”*

Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Arbovírus é o acrônimo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos. Estes podem causar surtos importantes envolvendo animais e humanos. Arbovírus como Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Febre Amarela (YFV) e Chikungunya (CHIKV) causaram epidemias importantes no Brasil nas últimas décadas. Febre, artralgia, mialgia, dor retroorbital, cefaleia e exantema são sintomas iniciais comuns de infecções causadas por arbovírus. Devido à similaridade dos sintomas iniciais e do diagnóstico baseado em aspectos clínicos, arbovírus de circulação menos comum normalmente acabam não sendo detectados. A detecção da circulação de um arbovírus é importante para responder questões epidemiológicas, como sua origem e como ocorreu sua dispersão. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar reconstrução filogenética do *Flavivirus* Encefalite de Saint Louis (SLEV), detectado em Araraquara (SP) e Sinop (MT), como também do *Orthobunyavirus* Oropouche (OROV) e de seus recombinantes (*OROV-like viruses*), detectados no município de Ji-Paraná (RO). As amostras provenientes dos três municípios foram previamente testadas para a presença de *Flavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*. O RNA viral foi obtido por dois métodos de extração e amplificado por PCR para posterior sequenciamento dos *amplicons* gerados. Em seguida, foi feita análise filogenética de sequências parciais dos genes que codificam a proteína NS5 de SLEV e o segmento S de OROV/*OROV-like*. A reconstrução filogenética sugere que o genótipo V de SLEV estava circulando em Araraquara (SP) e Sinop (MT). Devido à amplificação apenas do segmento S, não foi possível diferenciar OROV de *OROV-like viruses*. O presente estudo revela que arbovírus estão sendo sub-detectados no Brasil, circulando de forma silenciosa, e que a vigilância de pacientes febris que apresentam sintomas semelhantes aos da dengue deve abranger outros arbovírus importantes e emergentes.

Palavras-chave: Arbovírus, SLEV, OROV, *OROV-like virus* e Reconstrução Filogenética.

Abstract

Arbovirus is an acronym of arthropod-borne viruses. They can cause important outbreaks involving animals and humans. Arboviruses like Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Yellow Fever (YFV), and Chikungunya (CHIKV) have been responsible for important epidemics in Brazil over the last decades. Fever, arthralgia, myalgia, retro-orbital pain, headache and rash are common initial symptoms found in infections by arboviruses. Due to the similar initial symptoms and diagnosis based on clinical aspects, several less frequent viruses are usually not even detected. The detection of a circulating arbovirus is important to tackle epidemiological questions, such as its origin and how it has spread. Therefore, the aim of this study was to perform the phylogenetic reconstruction of the *Flavivirus* Saint Louis Encephalitis (SLEV) that was detected in Araraquara (SP) and Sinop (MT), as well the *Orthobunyavirus* Oropouche (OROV) and its recombinants (OROV-like viruses) from Ji-Paraná (RO). Samples from the three cities were tested previously for the presence of *Flavivirus*, *Alphavirus* and *Orthobunyavirus*. Viral RNA was extracted with two methods and amplified by PCR for sequencing the generated amplicons. Thereafter, phylogenetic analysis were performed using partial sequences of the genes that encoding the NS5 protein of the SLEV and the S segment of the OROV/OROV-like. The phylogenetic reconstruction suggests that the genotype V of SLEV was circulating in Araraquara (SP) and Sinop (MT). Since only the S segment presented amplification, it was not possible to differentiate OROV from the OROV-like viruses. This study reveals that arboviruses are being under detected in Brazil showing silent circulation, and that the surveillance in febrile patients with dengue-like symptoms should include other important and emerging arboviruses.

Key-words: Arboviruses, SLEV, OROV, OROV-like virus and Phylogenetic Reconstruction.

Lista de ilustrações

Figura 1. Organização da partícula viral e do genoma de <i>Flavivirus</i>	18
Figura 2. Organização da partícula viral e do genoma de <i>Orthobunyavirus</i>	23
Figura 3. Vírus resultantes de recombinação entre Oropouche (OROV) e outros <i>Orthobunyavirus</i> do sorogrupo Simbu.....	26
Figura 4 Representação cartográfica da localização de Araraquara (SP), Ji-Paraná (RO) e Sinop (MT) no território brasileiro.....	31
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose para confirmação de isolamento viral na primeira passagem.....	49
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para confirmação de isolamento viral na segunda passagem.....	50
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para confirmação de isolamento viral na segunda passagem.....	51
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose dos <i>amplicons</i> de parte do segmento S de OROV/OROV-like obtidos via PCR.....	52
Figura 9. Análise Filogenética de SLEV, conduzida no MEGA7.....	57
Figura 10. Análise Filogenética de parte do segmento S de <i>Orthobunyavirus</i> , conduzida no MEGA7.....	59

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação das amostras utilizadas no trabalho, ressaltando local de origem, tipo de material, ano de coleta e resultado de detecção viral prévia.....	33
Tabela 2. Primes utilizados nas reações de RT-PCR para amplificação parcial da região codificadora da proteína NS5 de <i>Flavivirus</i>	37
Tabela 3. Primer utilizado na reação de RT-N-PCR para amplificação parcial da região codificadora da proteína NS5 de SLEV.....	38
Tabela 4. Primes utilizados nas reações de RT-N-PCR para amplificação parcial do segmento S de OROV/ <i>OROV-like</i>	39
Tabela 5. Primes utilizados nas reações de N-PCR para amplificação parcial dos segmentos M e L de OROV.....	41
Tabela 6. Sequências parciais do gene codificador da proteína NS5 de SLEV selecionadas no GenBank.....	45
Tabela 7. Sequências de parte do segmento S de <i>Orthobunyavirus</i> , entre eles OROV e <i>OROV-like</i> , selecionadas no GenBank.....	47
Tabela 8. Tamanho dos <i>amplicons</i> de SLEV obtidos a partir do sequenciamento dos produtos de PCR encontrados nas amostras do estudo.....	53
Tabela 9. Tamanho dos <i>amplicons</i> de OROV/ <i>OROV-like</i> obtidos a partir do sequenciamento dos produtos de N-PCR encontrados nas amostras do estudo.....	54
Tabela 10. Sequências identificadas pelo BLAST que confirmam o sequenciamento de fragmentos de parte da região codificadora da proteína NS5 de SLEV.....	55
Tabela 11. Sequências identificadas pelo BLAST que confirmam o sequenciamento de fragmentos de parte do segmento S de OROV/ <i>OROV-like</i>	55

Lista de abreviaturas e siglas

CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro de controle e prevenção de doenças)
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus do Dengue
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê internacional taxonômico de vírus)
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
MAYV	Vírus Mayaro
MVEV	Vírus da Encefalite do Vale do Murray
Nested	Nested Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase nested)
ORF	Open Reading Frame (Fase de leitura aberta do genoma)
OROV	Vírus Oropouche
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da polimerase)
RdRp	RNA-dependent RNA Polymerase (RNA polimerase dependente de RNA)
RT	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa)
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
TA	Temperatura ambiente
UTR	Untranslated Region (Região não codificadora do genoma)
WHO	World Health Organization (Organização mundial da saúde)
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

Sumário

Capítulo 1.....	15
1. Introdução.....	15
1.1. Arbovírus.....	15
1.2. Brasil como fonte de arbovírus.....	15
1.3. Arbovírus emergentes.....	16
1.4. Flavivirus.....	17
1.4.1. Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV).....	18
1.4.1.1. Transmissão.....	18
1.4.1.2. Manifestações clínicas.....	19
1.4.1.3. Epidemiologia da doença.....	19
1.4.1.4. Diversidade genética.....	21
1.5. Orthobunyavirus.....	22
1.5.1. Vírus Oropouche (OROV).....	23
1.5.1.1. Transmissão.....	23
1.5.1.2. Manifestações clínicas.....	24
1.5.1.3. Epidemiologia da doença.....	24
1.5.1.4. Diversidade genética e Recombinação.....	25
1.6. Análise Filogenética.....	26
2. Objetivos.....	29
2.1. Geral.....	29
2.2. Específicos.....	29
3. Material e Métodos.....	30
3.1. Cidades.....	30
3.1.1. Araraquara (SP).....	30
3.1.2. Ji-Paraná (RO).....	30
3.1.3. Sinop (MT).....	31
3.2. Representação cartográfica de Araraquara (SP), Ji-Paraná (RO) e Sinop (MT).....	32
3.3. Amostras.....	32
3.4. Avaliação ética.....	33
3.5. Isolamento viral.....	34

3.5.1. Extração de RNA viral dos sobrenatantes.....	34
3.6. Extração de RNA viral das amostras clínicas.....	35
3.7. <i>Pool</i> de mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i>	36
3.8. Amplificação parcial do genoma viral para sequenciamento.....	36
3.8.1. RT-N-PCR com primers espécie-específicos para SLEV.....	36
3.8.2. RT-N-PCR com primers espécie-específicos para vírus OROV/OROV-like.....	38
3.8.3. Amplificação parcial dos segmentos M e L.....	39
3.8.3.1. RT.....	39
3.8.3.2. PCR com primers espécie-específicos para OROV.....	40
3.8.3.3. N-PCR com primers espécie-específicos para OROV.....	40
3.9. Eletroforese em gel de agarose 1%.....	41
3.10. Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento.....	42
3.11. Marcação dos produtos de PCR para sequenciamento.....	42
3.12. Purificação dos produtos de sequenciamento.....	42
3.13. Sequenciamento.....	43
3.14. Confirmação pelo BLAST.....	43
3.15. Alinhamento.....	44
3.15.1. <i>Dataset</i>	44
3.16. Análise Filogenética.....	48
4. Resultados.....	49
4.1. Isolamento Viral.....	49
4.1.1. Primeira passagem.....	49
4.1.2. Segunda passagem.....	50
4.1.3. Amplificação parcial dos segmentos M e L de OROV.....	50
4.2. Confirmação prévia da presença de arbovírus.....	51
4.3. Sequenciamento parcial da região codificadora da proteína NS5 de SLEV.....	52
4.4. Sequenciamento parcial do segmento S de OROV/OROV-like.....	53
4.5. Confirmação pelo BLAST.....	54
4.6. Análise Filogenética.....	55
5. Discussão.....	60
6. Conclusões.....	67

7. Referências Bibliográficas.....	68
Capítulo 2.....	88
1. Artigo.....	88

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Arbovírus

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos (REEVES, 2001). Os artrópodes são responsáveis por transmitir mais de 17% de todas as doenças infecciosas no mundo, causando mais de 700.000 mil mortes ao ano (KUNO et al., 2005; WHO, 2019). A maioria dos vetores de arbovírus são mosquitos, que se infectam no momento do repasto sanguíneo ou por transmissão vertical (KUNO et al., 2005). No caso de infecção por repasto sanguíneo, esta não necessita necessariamente de um hospedeiro com alta viremia (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019).

A transmissão dos arbovírus aos seus vetores pode ocorrer através de dois ciclos: urbano e silvestre (WEAVER; BARRETT, 2004). Há mais de 500 espécies de arbovírus, dos quais 150 causam doenças em seres humanos, cujas manifestações clínicas variam desde doença febril leve a síndromes febris neurológicas, articulares e hemorrágicas (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

A Organização das Nações Unidas projeta que em 2050 a população mundial girará em torno de 9,6 bilhões de pessoas (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2013). O risco de transmissão indireta de vírus, ou seja, através de vetores, aumenta com a densidade populacional humana (BRAACK et al., 2018), além do aumento da infestação (FERREIRA; CHIARAVALLI NETO; MONDINI et al., 2018). Outros dois fatores que contribuem para a dispersão mundial dos arbovírus são o aumento do fluxo de indivíduos e de mercadorias, intensificados pela globalização, e as mudanças climáticas, que ampliam os nichos ecológicos dos agentes transmissores (CAMPBELL-LENDRUM et al., 2015).

1.2. Brasil como fonte de arbovírus

O Brasil possui uma área total de mais de 8,5 milhões de km², estando a maior parte do território localizada na zona climática tropical (IBGE, 2019a). A presença de diferentes biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal,

contribui para riqueza em termos de fauna e flora do país (IBGE 2019b). Um ecossistema de grande biodiversidade acaba favorecendo a circulação de arbovírus, os quais são mantidos no ambiente por meio de ciclos zoonóticos. A população brasileira é estimada em mais de 210 milhões de habitantes (IBGE, 2019c) e aproximadamente 86% das pessoas vivem em áreas urbanas (IBGE, 2019d), locais que já foram ou ainda podem ser invadidos por transmissores de arbovírus. Até o final da década de 90 apontava-se que haviam sido isoladas mais de 200 espécies de arbovírus no Brasil, sendo aproximadamente 40 causadoras de doenças em humanos (FIGUEIREDO et al., 2007; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

Disparidades regionais afetam o diagnóstico de pacientes infectados por arbovírus no país. A ausência de profissionais qualificados e de equipamentos adequados nos locais afastados dos grandes centros implica na investigação das doenças através da sintomatologia e de testes imunológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; 2017b; 2019b). Considerando que os arbovírus causam doença febril, diagnósticos em que não há a detecção viral podem ser imprecisos (FIGUEIREDO, 2000). E uma vez que não haja identificação de introdução ou de circulação de um arbovírus, este pode se dispersar de forma silenciosa pelo território.

1.3. Arbovírus emergentes

Os vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) ganharam destaque no cenário epidemiológico brasileiro, respectivamente, em 2014 e 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; MLAKAR et al., 2016). Em 2016, o país se deparou com a reemergência do Vírus da Febre Amarela (YFV) silvestre e enfrenta, historicamente, epidemias de grandes proporções causada pelo dengue (DENV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). A similaridade dos sintomas iniciais das doenças dificulta a identificação do agente etiológico, principalmente em locais onde há a circulação de diversos arbovírus, como é o caso do Brasil.

Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e *Peribunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*) são as três principais famílias cujos membros são causadores de importantes problemas de saúde pública em humanos (WEAVER; REISEN, 2010).

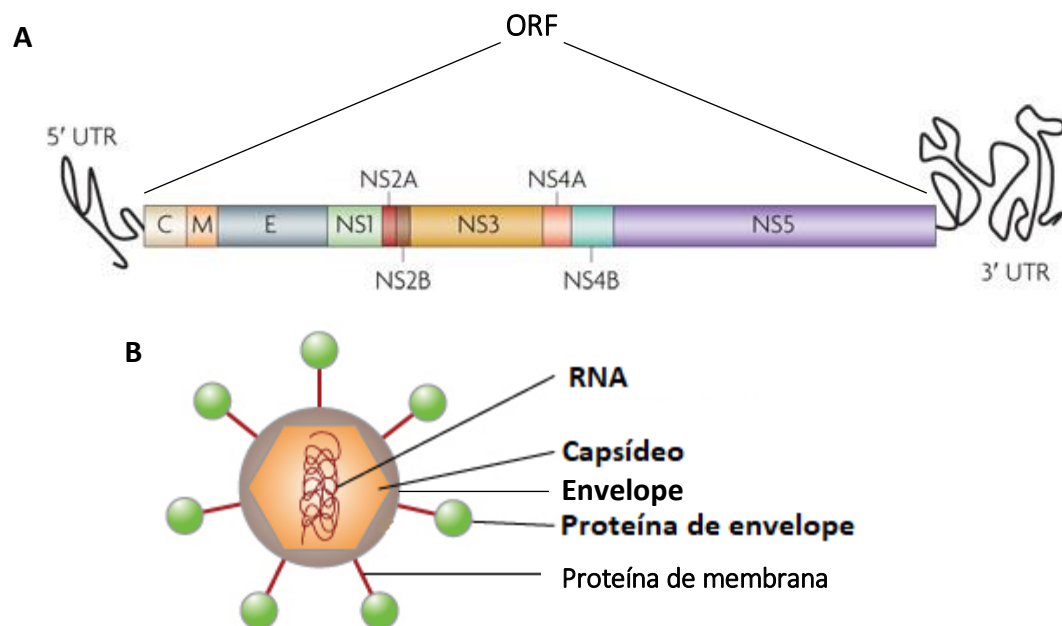
1.4. Flavivirus

Segundo o Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV, 2018), há o registro de 53 espécies de *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). Estes são vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva (ssRNA+). Uma única *open reading frame* (ORF) com cerca de 11 kb codifica as proteínas necessárias para sua replicação: C (capsídeo), prM (pré-membrana), E (envelope), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A região codificadora das proteínas estruturais C, M e E compreende um quarto do genoma viral. No restante do genoma estão os genes codificadores das proteínas não-estruturais; flanqueando a ORF estão as regiões não codificadoras (UTRs) 5' e 3' (CHAMBERS et al., 1990; RICE; STRAUSS; STRAUSS, 1986; WESTAWAY, 1987).

A proteína C é responsável pela translocação da proteína prM ao retículo endoplasmático para que esta seja clivada, além de formar o nucleocapsídeo, o qual envolve o material genético viral. A proteína prM sofre clivagem e gera a proteína M, uma proteína de membrana de partículas virais maduras. A proteína E é a parte mais externa da partícula viral e, por isso, é o principal alvo de anticorpos, além de atuar em várias etapas do ciclo de vida viral: montagem da partícula, brotamento, ligação e fusão à membrana da célula hospedeira (LINDENBACH et al., 2013) (Figura 1).

NS1 é uma proteína não-estrutural antigênica, secretada no espaço extracelular, que neutraliza o sistema complemento e auxilia na formação de imunocomplexos, além de participar da replicação viral. NS2A forma complexos de replicação com NS3 e NS5, atua na montagem da partícula viral e inibe a resposta de interferon. NS2B atua como co-fator para função serina transferase da proteína NS3, e também inibe a resposta de interferon. NS3 é uma proteína multifuncional: apresenta funções de serina protease, RNA helicase e nucleotídeo trifosfatase. NS4A e NS4B inibem a via de sinalização de interferon. Já a proteína NS5, tem atividade metiltransferase e RNA polimerase dependente de RNA (LINDENBACH et al., 2013) (Figura 1).

Figura 1. Organização da partícula viral e do genoma de *Flavivirus*. (A) O genoma dos *Flavivirus* é constituído por uma única ORF (*open reading frame*), flanqueada por regiões não codificadoras (UTRs) 5' e 3'. A poliproteína codificada na ORF é processada em três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E), e sete não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. (B) O RNA viral é envolvido pelo capsídeo, o qual está rodeado pelo envelope, onde estão incrustadas as proteínas de envelope e membrana. Fonte: Guzman et al., 2010 modificado.



1.4.1. Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)

O vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, e ao sorogrupo do Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (CALISHER et al. 1989).

1.4.1.1. Transmissão

Aves e mosquitos do gênero *Culex* fazem parte do seu ciclo silvestre de transmissão (REISEN, 2003). *Cx. Pipiens*, *Cx. Quinquemfasciatus*, *Cx. tarsalis* e *Cx. Nigripalpus* são as principais espécies transmissoras nos EUA. No México, Caribe e na América do Sul o vírus já foi isolado de mosquitos do gênero *Culex*, incluindo *Cx. erraticus* (HOYOS-LÓPEZ et al., 2015), *Cx. tarsalis*, *Cx. pipiens*, *Cx. nigripalpus*, (MCLEAN; BOWEN, 1980; THEILER; DOWNS, 1973) *Cx. quinquemfasciatus*, *Cx. interfor* (DIAZ et al., 2006), e de mosquitos de outros gêneros, como *Mansonia*

(BERANEK et al., 2018; HOYOS-LÓPEZ et al., 2015; ; HOYOS-LÓPEZ et al., 2016), *Haemagogus* e *Sabethes* (CAUSEY; SHOPE; THEILER, 1964). Também foi demonstrada a capacidade de transmissão por parte dos gêneros *Aedes*, *Psorophora* e *Theobaldia* (HAMMON; REEVES, 1943; DIAZ et al., 2012). As aves são, normalmente, os hospedeiros amplificadores de SLEV (REISEN et al., 2003), porém o vírus já foi isolado de camundongos, roedores (DE SOUZA LOPES et al., 1979), equinos (ROSA et al., 2013) e primatas não-humanos (*Alouatta caraya*) (MORALES et al., 2017). No ciclo urbano, os principais transmissores de SLEV também são mosquitos do gênero *Culex* (DIAZ et al., 2006; HEINEN et al., 2015). SLEV causa epidemias em humanos anualmente nos EUA (KRAMER; CHANDLER, 2001). Nos países da América do Sul, o vírus normalmente é isolado esporadicamente de humanos, tendo sido responsável por surtos na Argentina e no Brasil (CHAROSKY et al., 1968; MONDINI et al, 2007a; PINHEIRO et al., 1981a; SPINSANTI et al., 2008).

1.4.1.2. Manifestações clínicas

De acordo com o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), menos de 1% das infecções causadas por SLEV tem sintomatologia aparente. O início da doença normalmente é abrupto, podendo ocorrer febre, cefaleia, tontura, náusea e mal-estar. Alguns pacientes se recuperam espontaneamente após alguns dias, porém, outros desenvolvem sinais de infecções do sistema nervoso central, como rigidez do pescoço, confusão, desorientação, tontura, tremores e instabilidade. As maiores taxas de desenvolvimento de encefalite estão entre os idosos. A proporção geral entre casos de fatalidade é de 5 a 15%, sendo que as chances da ocorrência se elevam com a idade (CDC, 2018).

1.4.1.3. Epidemiologia da doença

SLEV foi isolado pela primeira vez durante um surto de encefalite em Saint Louis e Kansas City, nos EUA, entre agosto e setembro de 1933. Diferentes linhagens do vírus foram isoladas de tecidos cerebrais dos oito casos letais de encefalite que ocorreram na ocasião. Camundongos foram inoculados com material oriundo dos casos humanos e apresentaram sintomas característicos da doença, como tremores,

convulsões e prostração, decorrentes de lesões no sistema nervoso central (WEBSTER; FITE, 1933).

Até a década de 60, casos de infecções causadas por SLEV foram registrados em diferentes localidades dos EUA, muitos em zonas rurais, o que acabava por dificultar o estudo deste vírus (BLATTNER; HEYS, 1945; BRODY; BROWNING, 1960; GIDDINGS et al., 1959; HAMMON, 1941; MEIKLEJOHN; HAMMON, 1942; LENNETTE; LONGSHORE, 1951; KUNIN; CHIN, 1957; RANZENHOFER et al., 1957; SHINNER, 1963). No ano de 1964, SLEV foi responsável por um surto de encefalite em Houston, com 149 suspeitas de doença neuroinvasiva. A infecção foi confirmada em 56% dos 119 pacientes que tiveram seu material biológico analisado. Mais de 60% dos infectados estavam acima dos 50 anos, sendo que todos os óbitos ocorreram nessa faixa etária ou superior. (RIGGS; SMITH; PHILLIPS, 1965). As manifestações clínicas eram parecidas com as relatadas em surtos anteriores: cefaleia, febre, vômito, letargia, tremores (MUCKENFUSS, 1934). Entre 1955 e 1978, SLEV foi responsável por quase 70% dos casos de encefalite causados por arbovírus no EUA (MONATH, 1979).

Durante um surto de meningoencefalite em 1960, na cidade de Hermosillo, no México, 51 pacientes apresentando febre, vômito, rigidez de nuca e letargia foram hospitalizadas. O soro de 12 pacientes revelou que todos apresentavam anticorpos contra SLEV. Entre agosto e setembro de 1974, o vírus foi responsável por outro surto no mesmo local, afetando principalmente menores de 16 anos (GONZÁLEZ et al., 1975).

O primeiro surto causado por SLEV no Canadá ocorreu em cidades do Sul do estado de Ontario, no ano de 1975 (SPENCE et al., 1977). Testes sorológicos confirmaram a infecção pelo vírus em pacientes apresentando febre, cefaleia, calafrios, mal-estar, anorexia, dor e rigidez no pescoço, mialgia, fotofobia, náusea, vômito, sonolência e confusão. A maioria dos doentes possuía mais de 40 anos. Em 1975, mais de 25 estados do norte dos EUA registraram surtos de encefalite causados por SLEV, sendo o surto do Canadá uma provável extensão destes últimos (DONOVAN; BOWMAN, 1942).

O primeiro caso de encefalite causado por SLEV na Argentina ocorreu em 1968 (CHAROSKY et al., 1968). Em 1971 dois casos de doença febril com agravamento infecção foram confirmados após isolamento viral (METTLE; CASALS, 1971). Entre 1965 e 1966, um estudo sorológico conduzido em Córdoba revelou a

presença de anticorpos anti-SLEV em 11% da população masculina cujas amostras foram analisadas (EVANS et al., 1971). Um paciente apresentando meningoencefalite foi diagnosticado com infecção por SLEV em 1985 (DURLACH; ASTARLOA, 1985). Spinsanti e colaboradores (2002) mostraram uma prevalência ainda maior de anticorpos anti-SLEV na população de homens e mulheres, mais de 13%. Em 2005 ocorreu a primeira epidemia causada pelo vírus no país (SPINSANTI et al., 2008).

O primeiro caso confirmado de infecção por SLEV no Brasil em humano ocorreu em 1978, no Belém (PA) (PINHEIRO et al., 1981a). Vigilâncias sorológicas posteriores mostraram a presença de anticorpos contra SLEV na população das regiões amazônica, leste e sudeste do país (IVERSSON, 1994; TRAVASSOS DA ROSA, 1998). Em 2006, no município de São José do Rio Preto (SP), ocorreu o primeiro surto causado pelo vírus. Até então, nenhum doente havia apresentado sinais de encefalite ou de doença hemorrágica, apenas doença febril (MONDINI et al., 2007a; MONDINI et al., 2007b). SLEV também foi responsável por casos esporádicos de infecção em São Paulo (SP) (MAIA et al., 2014), Ribeirão Preto (SP) (ROCCO et al., 2005) e Cuiabá (MT) (HEINEN et al., 2015).

1.4.1.4. Diversidade genética

Evidências epidemiológicas e experimentais mostraram que linhagens de SLEV possuíam características biológicas diferentes umas das outras (TSAI, 1988). Algumas dessas características eram o aumento da neurovirulência e da habilidade em causar viremia em pássaros, e a capacidade de infectar mosquitos. Tais observações foram relacionadas à origem geográfica de cada estirpe. Análises genéticas também revelaram que cepas selvagens se diferenciavam daquelas isoladas durante surtos e epidemias (BOWE et al., 1980; MONATH et al., 1980; TRENT et al., 1980).

SLEV é classificado em oito genótipos com base em análises filogenéticas do gene E e do genoma completo (KRAMER; CHANDLER, 2001; RODRIGUES et al., 2010). Levando em conta as duas classificações, pode-se observar que os genótipos I e II circulam pela América do Norte e América Central; nesta última, exclusivamente, são encontrados os genótipos IV e VI e que na América do Sul predomina a circulação dos genótipos III, V, VII e VIII (BAILLIE et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010). No Brasil, já foi detectada a circulação dos genótipos II (KRAMER; CHANDLER, 2001),

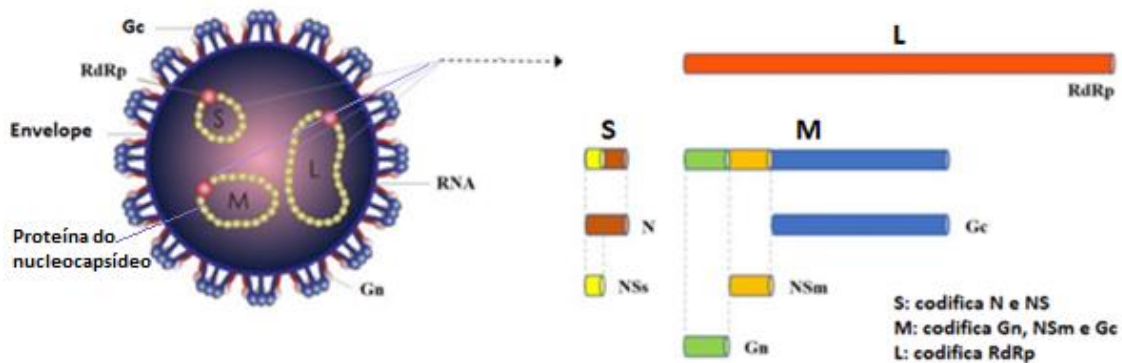
III (dos SANTOS et al., 2006), V (VEDOVELLO et al., 2015) e VIII (RODRIGUES et al., 2010) de SLEV.

1.5. Orthobunyavirus

O gênero *Orthobunyavirus* (família *Peribunyaviridae*) é composto por mais de 170 vírus, de 19 sorogrupos (CARDOSO et al., 2015; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Estes têm material genético constituído por três segmentos de RNA, de diferentes tamanhos, com polaridade negativa (ssRNA-) (MURPHY; HARRISON; WHITFIELD, 1973). Os segmentos são nomeados de acordo com o tamanho, sendo S (small - pequeno), M (medium - médio) e L (large - grande).

A ORF do segmento L codifica a proteína L, com atividade RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). No segmento M também está presente apenas uma ORF, que codifica uma poliproteína, a qual sofre clivagem durante a tradução e gera as glicoproteínas Gn e Gc, e a proteína não-estrutural NSm (DIETZGEN et al., 2012). Gn e Gc são antigênicas e responsáveis pela fusão à membrana da célula hospedeira (ACRANI et al., 2010; GARRY; GARRY, 2004). A função da proteína NSm pode estar relacionada à montagem da partícula viral no complexo de Golgi (ELLIOTT; SCHMALJOHN, 2013). Há duas ORFs sobrepostas no segmento S, que codificam a proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína não-estrutural NSs (TILSTON-LUNEL et al., 2015). O RNA viral é envolto por múltiplas proteínas do nucleocapsídeo, sendo esta associação crítica para a expressão da RdRp (ARIZA et al., 2013). A proteína NSs regula a atividade RNA polimerase dependente de RNA, atua como antagonista de interferon e promove silenciamento gênico (ELLIOTT; SCHMALJOHN, 2013) (Figura 2).

Figura 2. Organização da partícula viral e do genoma de *Orthobunyavirus*. O RNA dos *Orthobunyavirus* é formado por três segmentos: L (large), M (medium) e S (small). Estes são envoltos pelas proteínas do nucleocapsídeo e pelo envelope, onde estão incrustadas as glicoproteínas Gn e Gc. O segmento L codifica a RNA polimease dependente de RNA (RdRp); o segmento M codifica as glicoproteínas Gn e Gc, e a proteína NSm; o segmento S codifica as proteínas do nucleocapsídeo e NS. Fonte: Sakkas et al., 2018 modificado.



1.5.1. Vírus Oropouche (OROV)

O Vírus Oropouche (OROV) é um *Orthobunyavirus*, membro da família *Peribunyaviridae*, que pertence ao sorogrupo do vírus Simbu (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

1.5.1.1. Transmissão

Mosquitos da espécie *Culicoides paraensis* foram identificados como os primeiros vetores de OROV no ciclo silvestre (ANDERSON et al., 1961). A competência vetorial também foi comprovada por meio de testes em laboratório (PINHEIRO et al., 1982). Apesar de o vírus ter sido detectado via reação em cadeia da polimerase nested (N-PCR) em mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, ensaios laboratoriais mostraram uma baixa capacidade de transmissão por parte da espécie (CARDOSO et al., 2015). OROV também já foi isolado de outras duas espécies de culicídeos: *Cq. Venezuelensis* (KARABATSOS, 1985) e *Ae. Serratus* (PINHEIRO et al., 1962). Mamíferos e pássaros são reservatórios naturais de OROV no ciclo silvestre. No Brasil, já foi isolado de preguiças (*Bradypus tridactylus*) (PINHEIRO et al., 1962), roedores (*Proechimys* spp.) (PINHEIRO et al., 1976) e primatas não-humanos (*Callithrix* sp.) (TEIXEIRA NUNES et al., 2005). Anticorpos anti-OROV foram

detectados em pássaros domésticos e de vida livre (PINHEIRO et al., 1976). O homem é, provavelmente, o único hospedeiro vertebrado no ciclo urbano de OROV (PINHEIRO et al., 1981b). Duas espécies de mosquitos são encontradas com maior frequência em epidemias urbanas: *Culicoides paraensis* e *Culex quinquefasciatus* (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

1.5.1.2. Manifestações clínicas

A infecção causada por OROV gera uma doença febril normalmente acompanhada de cefaleia, mialgia, artralgia, mal-estar, tontura, calafrios, náusea, vômito, fotofobia e dor retro orbital (MERCER et al., 2003; PINHEIRO; et al, 1982; PINHEIRO; ROCHA; FREITAS, 1982; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 2004). Manifestações neurológicas não são comuns, porém, já foram observadas no Amazonas e em São Paulo (BASTOS et al., 2012; VERNAL; MARTINI; DA FONSECA, 2019). A duração do quadro clínico pode variar de três a oito dias; não há notificação de óbitos associados à infecção por OROV (SAKKAS et al., 2018).

1.5.1.3. Epidemiologia da doença

OROV foi isolado pela primeira vez em 1955, em um trabalhador febril da floresta de Vega de Oropouche, Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1961). Décadas depois, foi isolado pela primeira vez no Panamá de doentes febris, durante o programa de vigilância para dengue, na área metropolitana da cidade do Panamá. Apesar deste fato, entre 1968 e 1978, um estudo sorológico mostrou a presença de anticorpos neutralizantes para OROV no soro de pacientes febris, sugerindo que o vírus já circulava no país antes da ocorrência de seu primeiro isolamento (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2017; SAKKAS et al., 2018; TESH, 1994; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

OROV também foi detectado no Peru. Em 1992, durante a vigilância para dengue no município de Iquitos, na região amazônica peruana, o vírus foi isolado do soro de cinco doentes febris (CHAVEZ; COLAN; PHILLIPS, 1992). Em 1994, outros dois municípios da região amazônica do país enfrentaram surtos causados pelo vírus (BAISLEY et al., 1998; WATTS et al., 1997), e em 2016, foi a vez de Cusco (ROMERO-

ALVAREZ; ESCOBAR, 2017). Mais recentemente, casos de infecção em humanos causados por OROV foram detectados no Equador (WISE et al., 2018).

Testes sorológicos indicaram que primeira epidemia causada por OROV no Brasil ocorreu em Belém (PA), em 1961, com aproximadamente 11.000 infecções (CARDOSO et al., 2015; MOURÃO et al., 2014; PINHEIRO et al., 1981b). DENV e OROV eram considerados, respectivamente, o primeiro e o segundo arbovírus mais prevalentes no país até 2015, quando CHIKV e ZIKV estabeleceram transmissão no país (FIGUEIREDO, 2007; TILSTON-LUNEL et al., 2015). Até a década de 80, OROV foi responsável por infecções restritas ao estado do Pará (ROSA et al., 1994). Entre 1980 e 1981, o vírus causou epidemias de maiores proporções no país, com mais de 100.000 casos em Manaus (AM) e Belém (PA) (TESH, 1994). Nas décadas seguintes, casos de infecção ocorreram em outros estados brasileiros como Amapá, Acre, Rondônia, Maranhão e Tocantins (LEDUC; PINHEIRO, 1986; PINHEIRO et al. 1981b; PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA, 1994).

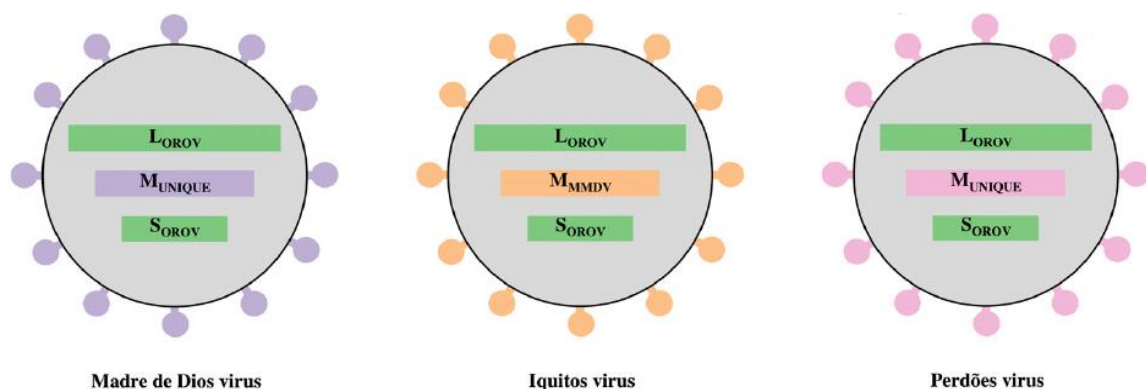
Nos anos 2000, OROV voltou a circular no estado do Pará, causando aproximadamente 18.000 casos de doença febril (AZEVEDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009). O vírus foi responsável por surtos epidêmicos em diferentes cidades do Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Tocantins (CARDOSO et al., 2015). O primeiro caso de infecção por OROV fora da região amazônica foi detectado em Ribeirão Preto (SP) em 2010, em uma paciente que retornava de viagem a uma cidade costeira da região nordeste, sem circulação conhecida de OROV (DE SOUZA LUNA et al., 2017).

1.5.1.4. Diversidade genética e Recombinação

Com base em análises filogenéticas do gene N, localizado no segmento S, Saeed e colaboradores (2000a) classificaram OROV em três genótipos (I-III). Dez anos mais tarde, no entanto, evidências mostraram a existência de um quarto genótipo do vírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017, VASCONCELOS et al., 2011). O genótipo I inclui cepas isoladas em Trinidad e Tobago e no Brasil; no genótipo II alocam-se cepas do Brasil e no Peru; isolados do Brasil e do Panamá fazem parte do genótipo III. O genótipo IV é constituído de cepas isoladas apenas no Brasil (AZEVEDO et al., 2007; TERZIAN et al., 2009; TEIXEIRA NUNES et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2011).

O gênero *Orthobunyavirus* é conhecido pela diversidade de membros, que é resultado do mecanismo de recombinação gênica. Esta ocorre quando dois vírus infectam simultaneamente uma célula, o que pode acontecer tanto em vetores como em hospedeiros susceptíveis à infecção (BRIESE; CALISHER; HIGGS, 2013; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Jatobal (JATV) foi identificado como o primeiro vírus resultante de recombinação (*OROV-like virus*) associada a OROV (SAEED et al., 2001). Anos depois, estudos mostraram a existência de outros *OROV-like viruses*: Iquitos (IQTV) (AGUILAR et al., 2011), Madre de Dios (MDDV) (LADNER et al., 2014; NAVARRO et al., 2016) e Perdões (PERDV) (TISLTON- LUNEL et al., 2015) (Figura 3).

Figura 3. Vírus resultantes de recombinação entre Oropouche (OROV) e outros *Orthobunyavirus* do sorogrupo Simbu. OROV: Vírus Oropouche; L: segmento L; M: segmento M; S: segmento S; MDDV: Vírus Madre de Dios, M *unique*: segmento M único. Fonte: Travassos da Rosa et al., 2017.



1.6. Análise Filogenética

A filogenia é o estudo das relações evolutivas entre os organismos, as quais são determinadas a partir de uma análise filogenética. Na virologia, a análise filogenética é utilizada para compreender a origem e a dispersão dos vírus. Através dela é possível, por exemplo, estabelecer relações entre um vírus e uma doença, determinar padrões de transmissão, monitorar programas de imunização, reconstruir a história evolucionária de epidemias, classificar novos vírus (MCCORMACK; CLEWLEY, 2002).

Numa análise filogenética podem ser utilizadas sequências nucleotídicas ou de aminoácidos (CALDART et al., 2016). A primeira etapa do processo consiste na

organização das sequências através de um alinhamento. O objetivo deste é organizar sítios homólogos (MCCORMACK; CLEWLEY, 2002), o que é feito por algoritmos, implantados em diferentes *softwares*, inclusive de acesso livre, como ClustalW e MAFFT (KATO et al., 2005; THOMPSON; HIGGINS; GIBSON; 1994).

A segunda etapa constitui-se da escolha de um modelo evolutivo, também chamado de modelo de substituição de nucleotídeos, que avalia a frequência de tais substituições após o alinhamento. O melhor modelo pode ser selecionado através de testes estatísticos, que buscam encontrar o nível mais adequado de complexidade considerando as sequências (POSADA; CRANDALL, 2001). Os mesmos são promovidos por programas computacionais, tal qual jModelTest (POSADA, 2008; POSADA, 2009).

Por fim, é selecionado o método estatístico para a construção da árvore filogenética. Tais métodos podem ser baseados em distância ou probabilidade. Os métodos de distância convertem as sequências em uma matriz de dados, consistindo das distâncias genéticas entre todos os pares. Estas distâncias na matriz se referem ao número de diferenças entre cada par de sequências e são calculadas usando um modelo evolutivo, o qual mostra como ocorreram as substituições de nucleotídeos, desde o ancestral comum. Uma árvore é então construída a partir dos dados numéricos da matriz de distância das sequências mais próximas umas das outras (MCCORMACK; CLEWLEY, 2002). *Neighbour-joining* é um exemplo de método de distância (SAITOU; NEI, 1987). Entre os métodos probabilísticos estão Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Mediante à construção de diversas árvores que explicam os dados fornecidos pelo alinhamento, é selecionada aquela que minimiza o número de etapas evolutivas (alterações de nucleotídeos) no primeiro caso (MCCORMACK; CLEWLEY, 2002), a mais verossímil no segundo (FELSENSTEIN, 1981) e *a posteriori* no terceiro (HUELSENBECK et al., 2001).

A confiança da análise filogenética pode ser avaliada por meio do teste de *Bootstrap*. O mesmo corresponde o percentual de vezes em que um grupo se manteve na mesma posição, considerando a criação de novos alinhamentos (MCCORMACK; CLEWLEY, 2002). Este último processo é repetido diversas vezes, normalmente, 1000.

Na análise filogenética dos *Flavivirus*, comumente são utilizadas sequências que compreendem o gene E. Entretanto, existem regiões mais conservadas do

genoma dos mesmos, as quais estão menos sujeitas à pressão seletiva do meio devido às funções que desempenham, como é o caso da região codificadora da proteína NS5 (FULOP et al., 1993; RICE; STRAUSS; STRAUSS, 1986; WESTAWAY, 1987). Já no caso dos *Orthobunyavirus*, são usadas partes de sequências dos três segmentos que compõem o seu genoma. A utilização de todos se faz necessária para a identificação correta do vírus, uma vez que estes podem sofrer recombinação gênica (BRIESE; CALISHER; HIGGS, 2013; TILSTON-LUNEL et al., 2015; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a dispersão de SLEV e de OROV/*OROV-like* que circularam entre 2011 e 2016 em três municípios de três diferentes estados brasileiros utilizando análise filogenética.

2.2. Específicos

- Realizar sequenciamento parcial da região codificadora da proteína NS5 de SLEV e dos segmentos S, L e M de OROV/*OROV-like*;
- Definir o genótipo de SLEV que circulou em Araraquara (SP) e Sinop (MT);
- Avaliar a circulação de OROV/*OROV-like* com base em reconstrução filogenética de partes dos segmentos S, M e L;
- Definir o genótipo de OROV que circulou em Ji-Paraná (RO).

3. Material e Métodos

3.1. Cidades

3.1.1. Araraquara (SP)

Araraquara é uma cidade do interior do estado de São Paulo, localizada a 270 km da capital paulista (PREFEITURA MUNICIPAL DE ARARAQUARA, 2018) (Figura 4). O clima no município é considerado tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno. As temperaturas médias anuais variam de 15 a 28°C, com precipitações médias entre 24 e 245 mm. Os meses de dezembro, janeiro e fevereiro apresentam os maiores índices pluviométricos (CEPAGRI, 2017).

O município é considerado um dos mais desenvolvidos do Brasil em termos de qualidade de vida, devido aos seus índices de saúde, renda e educação. Estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontavam uma população de 233.744 habitantes no ano de 2018 (IBGE, 2018a). Na cidade encontram-se empresas de diversos setores, tal qual aeronáutico, de agronegócios, alimentos/bebidas, atacado, distribuição, logística, metal mecânico, farmacêutico, energia, têxtil e tecnologia da informação (PREFEITURA MUNICIPAL DE ARARAQUARA, 2018). Uma grande gama de universidades também está presente no município. O fato de Araraquara estar no centro do estado de São Paulo e de possuir um elevado fluxo de indivíduos, graças à presença das mais diversas indústrias e de universidades, acaba por torná-la um potencial polo de dispersão viral.

3.1.2. Ji-Paraná (RO)

Ji-Paraná está localizada a leste do estado de Rondônia, a aproximadamente 320 km da capital Porto Velho (Figura 4). O clima da cidade é quente e úmido, com 24°C de temperatura média anual (PREFEITURA MUNICIPAL DE JI-PARANÁ, 2018).

Em 2018, sua população foi estimada em 127.907 habitantes (IBGE, 2018b). A ocupação da região se deu graças à migração populacional para o trabalho na extração do látex e no garimpo (PREFEITURA MUNICIPAL DE JI-PARANÁ, 2018). Por fazer parte da região Amazônica brasileira, Ji-Paraná pode ser considerada um ponto de circulação dos mais variados arbovírus.

3.1.3. Sinop (MT)

Sinop está localizada ao norte do estado do Mato Grosso, a cerca de 500 km de Cuiabá (Figura 4). O clima no município é tropical, quente e úmido, sendo o inverno seco e o verão chuvoso. As temperaturas anuais médias ficam entre 27 e 33°C. A precipitação média anual é de 1.900 mm (SINOP EM DADOS, 2018c).

A cidade apresenta alto índice de desenvolvimento municipal e qualidade de vida para a população, estimada em mais de 139.935 habitantes em 2018 (IBGE, 2018c). Situada em meio à rodovia BR-163, Sinop está a 1.400 quilômetros do Porto de Santarém, no Pará. O município conta com empresas de diferentes segmentos, como serviços, comércio, saúde, educação, agropecuária e madeira. Sinop é considerada a porta de entrada para a Amazônia Mato-Grossense (PREFEITURA MUNICIPAL DE SINOP, 2018). A localização privilegiada às margens da rodovia de maior extensão do Brasil aliada à movimentação de indivíduos, e à proximidade da região Amazônica são fatores propiciam a circulação de arbovírus no local.

Figura 4. Representação cartográfica da localização de Araraquara (SP), Ji-Paraná (RO) e Sinop (MT) no território brasileiro.



3.2. Representação cartográfica da localização de Araraquara (SP), Ji-Paraná (RO) e Sinop (MT)

A representação cartográfica dos três municípios foi feita com o *software* de distribuição gratuita QGIS (https://www.qgis.org/pt_BR/site/). Os dados geográficos utilizados estão disponíveis no Núcleo de Economia Regional e Urbana da Universidade de São Paulo – NEREUS (<http://www.usp.br/nereus/?dados=brasil>).

3.3. Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas durante três estudos independentes de vigilância viral em Araraquara (SP), Ji-Paraná (RO) e Sinop (MT). Em todos os municípios já havia um histórico da circulação de DENV, CHIKV e ZIKV (CVE, 2019; GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA, 2015 – 2019; GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO, 2016 – 2017).

A presença de arbovírus nas amostras foi confirmada através de reações de Multiplex-N-PCR (M-N-PCR) para *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* (DE MORAIS BRONZONI et al., 2005) durante as três vigilâncias. Um total de 18 espécimes biológicos foram selecionados, incluindo material proveniente de culicídeos fêmeas da espécie *Cx. quinquefasciatus* (Tabela 1), que foram armazenados à -80°C até a análise.

Tabela 1. Identificação das amostras utilizadas no trabalho, ressaltando local de origem, tipo de material, ano de coleta e resultado de detecção viral prévia.

Identificação	Local de origem	Tipo de amostra	Ano de coleta	Detecção viral prévia*
Ji04	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji12	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji13	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji14	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji15	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji16	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji17	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji18	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji19	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji20	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji22	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji45	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
Ji49	Ji-Paraná	Soro	2013	OROV/OROV-like
H278	Araraquara	Soro	2016	SLEV
H279	Sinop	Soro	2011	SLEV
H815	Sinop	Soro	2015	SLEV
H835	Sinop	Soro	2015	SLEV
<i>Pool de mosquitos</i>				
Ar17	Sinop	fêmea <i>Culex quinquefasciatus</i>	2014	SLEV

SLEV: Vírus da Encefalite de Saint Louis; OROV: Vírus Oropouche; *OROV-like*: Vírus resultantes de recombinação entre OROV e outros Vírus do gênero *Orthobunyavirus*. (*) Detecção através de metodologia proposta por de Moraes Bronzoni e colaboradores (2005).

3.4. Avaliação ética

Os protocolos do estudo foram aprovados pelos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCF UNESP (CAAE: 27464814.4.0000.5426/CAAE: 27491214.2.0000.5426) e da Universidade Federal do

Mato Grosso – UFMT Campus Universitário de Sinop (128/CEP-HUJM/2011 e 288.172/2013) e incluíam a abordagem presente nesse estudo.

3.5. Isolamento viral

O isolamento viral foi realizado em seis amostras de Ji-Paraná positivas para OROV/*OROV-like*: Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49. A primeira passagem viral em células C6/36 de *Aedes albopictus* foi realizada em placas com 12 poços. Quando as células atingiram confluência de aproximadamente 80%, a infecção foi realizada com 10 µL da amostra de interesse, diluída em 200 µL de meio de cultura L-15 (Leibovitz, Cultilab, Brasil) sem adição de soro fetal bovino (SFB), deixando-se apenas o suficiente para cobrir totalmente o tapete celular e garantir a adsorção viral. A placa foi incubada a 28°C (Diagtech DT-6150C, Brasil), onde permaneceu por duas horas, para garantir a máxima adsorção às células. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de meio L-15, complementado com 1% de SFB e mantida em estufa a 28°C por cinco dias, com supervisão diária para checagem de potenciais efeitos citopáticos. Os sobrenadantes foram aliquotados em tubos de polipropileno de 1,5 mL e armazenados a -80°C. A passagem em célula posterior ocorreu como descrito anteriormente, adicionando-se 200µL do sobrenadante da primeira passagem (FIGUEIREDO, 1990).

3.5.1. Extração de RNA viral dos sobrenadantes

O RNA viral foi extraído dos sobrenadantes utilizando-se Trizol® (Thermo Fisher, EUA), segundo orientações do fabricante. Um volume de 750 µL de Trizol® foi adicionado a 250 µL da amostra em um tubo de polipropileno de 1,5 mL para que ocorresse a lise celular, e a integridade do RNA liberado fosse mantida frente às RNAses. O material foi então agitado por inversão durante 15 segundos e incubado em temperatura ambiente (TA) por cinco minutos. Com a adição de 20 µL do solvente orgânico clorofórmio, há desnaturação de contaminantes proteicos, os quais se tornaram insolúveis na fase aquosa, onde permanece o RNA. Novamente, a solução foi homogeneizada durante 15 segundos (Scientifica Advanced IR Vortex Mixer - ZX4) e mantida em TA por 10 minutos. A fase orgânica e superior da solução trifásica, que contém o RNA total da amostra, foi então transferida para um novo tubo de 1,5 mL,

com a adição de 500 μ L de isopropanol a -20°C , para precipitação do RNA. A solução foi homogeneizada, mantida em TA por 10 minutos e centrifugada (HERMLE - Z 216 MK) a 12.000 rcf, a 4°C por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e foram adicionados 1.000 μ L de etanol 75% a -20°C , o qual promove a agregação das moléculas de RNA, fazendo-as precipitar. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 7.500 rcf a 4°C por cinco minutos. Os passos anteriores foram repetidos para garantir a purificação do RNA. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* formado permaneceu em TA para volatilização de etanol residual. O RNA foi então ressuspenso em 40 μ L de água livre de DNAase e RNAase (Sigma-Aldrich, EUA).

3.6. Extração de RNA viral das amostras clínicas

A extração do RNA viral de amostras clínicas foi feita com QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), segundo orientações do fabricante. Resumidamente, 140 μ L da amostra clínica foram adicionados a 560 μ L de tampão AVL e RNA *carrier* para início da lise e liberação de RNA. A amostra sofre primeiramente lise, devido às condições denaturantes do tampão AVL, que inativa RNases e garante o isolamento do material genético viral. O RNA *carrier* aumenta a afinidade do RNA viral à membrana fornecida pelo fabricante e limita a ação de atividade de RNAse residual. A solução foi homogeneizada durante 15 segundos (Scientifica Advanced IR Vortex Mixer - ZX4) e depois incubada por 10 minutos em TA. Foram adicionados 560 μ L de etanol 100% (Emsure, Merck-Millipore/EUA), seguidos de homogeneização por 15 segundos e centrifugação a 6.000 x g (Eppendorf 5418R). O etanol é utilizado para precipitação do RNA, garantindo recuperação do material genético nos passos seguintes. Posteriormente, 630 μ L da solução resultante foram aplicados à membrana de sílica e tubo coletor fornecidos pelo fabricante, que depois foi centrifugado a 6.000 x g por um minuto, havendo descarte do sobrenadante. O passo anterior foi repetido para garantir a adsorção do RNA, e para que proteínas e outros contaminantes que pudessem inibir processos posteriores não ficassem retidos na coluna. As lavagens com 500 μ L de tampão AW1, e centrifugação a 6.000 x g por um minuto, e com 500 μ L de tampão AW2, centrifugação a 20.000 x g por 3,5 minutos, aumentam significativamente a pureza do RNA e garantem a remoção de contaminantes, sem

afetar a afinidade deste à membrana. Por fim, 60 µL de tampão AVE foram adicionados à membrana para a liberação do RNA, sendo esta transferida para tubo de polipropileno de 1,5 mL, com posterior centrifugação a 6.000 x g. O tampão AVE possui 0,04% de azida sódica em água livre de RNAses para prevenir possíveis contaminações microbianas. O RNA foi estocado a -80 °C para análises posteriores.

3.7. Pool de mosquitos *Culex quinquefasciatus*

A coleta, bem como a extração do RNA viral do pool de mosquitos contendo uma fêmea da espécie *Culex quinquefasciatus* utilizado neste trabalho, foram feitos pela Prof^a. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFTM – Campus Sinop). A coleta foi feita durante a vigilância de flebotomíneos conduzida no município de Sinop (MT) (THIES et al., 2016). Para a captura, foram utilizadas armadilhas luminosas do CDC das seis horas da manhã às sete horas da noite, durante três noites consecutivas ao mês, em 12 locais diferentes de Sinop. Todo o trabalho de campo ocorreu de maio de 2014 a 2015. Os mosquitos adultos foram identificados de acordo com a morfologia e agrupados de acordo com a espécie, o gênero e os locais de coleta. O RNA viral foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Thermo Fisher, EUA), conforme orientações do fabricante. O material foi então transportado até Araraquara (SP), onde foi estocado a -80 °C para análises posteriores.

3.8. Amplificação parcial do genoma viral para sequenciamento

3.8.1. RT-N-PCR com *primers* espécie-específicos para SLEV

A amplificação parcial da região codificadora da proteína NS5 para sequenciamento e posterior análise filogenética foi realizada utilizando a metodologia de de Moraes Bronzoni (2005).

A reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT) foi realizada com 8,0 µL de RNA viral, 4,0 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,4 µL de DTT (Ditiotreitol) (0,1 M), 1,6 µL da solução de dNTPs (Desoxirribonucleotídeos) (2,5 mM), 1,0 µL de primer FG2 (15 µM) (Tabela 2), 0,5 µL

de inibidor de ribonuclease (RNaseOUT - Thermo Fisher, EUA), 1,0 μ L de enzima transcriptase reversa (M-MLV Reverse Transcriptase - Promega Corporation, EUA) mais o volume de água livre de DNAase e RNAase (Sigma-Aldrich, EUA) necessário para completar 20 μ L. A solução foi incubada em termociclador T100 (Bio-Rad, EUA) a 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita com 8,0 μ L do produto da RT, 5,0 μ L de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2,0 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 2,5 μ L da solução de dNTPs (2,5 mM), 1,0 μ L de primer FG1 (15 μ M) (Tabela 2), 0,2 μ L de enzima Taq Polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase - Promega Corporation, EUA) e água livre de DNAase e RNAase (Sigma-Aldrich, EUA) para completar 50 μ L. A solução foi incubada a 94° por um minuto e depois, a 94° por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por dois minutos durante 30 ciclos e, 72°C por cinco minutos.

Tabela 2. Primes utilizados nas reações de RT-PCR para amplificação parcial da região codificadora da proteína NS5 de *Flavivirus*.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
FG1 (+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	1.000
FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	

(+): forward; (-): reverse; pb: pares de base.

A N-PCR foi feita com 3,0 μ L do produto da RT, 5,0 μ L de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2,0 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 2,5 μ L da solução de dNTPs (25 mM), 1,0 μ L de primer nSLE (15 μ M) (Tabela 3), 0,2 μ L de enzima Taq Polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase - Promega Corporation, EUA) e água livre de DNAase e RNAase (Sigma-Aldrich, EUA) para completar 50 μ L. A solução foi incubada a 94° por um minuto e depois, a 94° por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por dois minutos durante 25 ciclos e, 72°C por cinco minutos.

Tabela 3. Primer utilizado na reação de RT-N-PCR para amplificação parcial da região codificadora da proteína NS5 de SLEV.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
nSLE (-)	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT	232

(+): foward; (-): reverse; pb: pares de base.

3.8.2. RT-N-PCR com primers espécie-específicos para vírus OROV/ROV-like

Foram feitas reações de RT-N-PCR para amplificação parcial do segmento S de vírus OROV/ROV-like (TERZIAN et al., 2011).

A RT-PCR foi feita com 8,0 µL de RNA viral, 4,0 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,4 µL de DTT (Ditiotreitol) (0,1 M), 1,6 µL da solução de dNTPs (Desoxirribonucleotídeos) (25 mM), 1,0 µL de primer C2ORO (15 µM) (Tabela 4), 0,5 µL de inibidor de ribonuclease (RNaseOUT - Invitrogen, EUA), 1,0 µL de enzima transcriptase reversa (Superscript II Reverse Transcriptase - Thermo Fisher, EUA/ M-MLV Reverse Transcriptase - Promega Corporation, EUA) mais o volume de água livre de DNAase e RNAase necessário para completar 20 µL. A solução foi incubada em termociclador T100 (Bio-Rad, EUA) a 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos.

Na PCR foram adicionados 8,0 µL do produto da RT, 5,0 µL de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,5 µL da solução de dNTPs (2,5 mM), 1,0 µL de primer S1ORO (15 µM) (Tabela 4), 0,2 µL de enzima Taq Polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase - Promega Corporation, EUA) e água livre de DNAase e RNAase para completar 50 µL. A solução foi incubada a 94° por um minuto e depois, a 94° por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por dois minutos durante 30 ciclos e, 72°C por cinco minutos.

A N-PCR foi feita com 3,0 µL do produto da RT, 5,0 µL de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,5 µL da solução de dNTPs (25 mM), 1,0 µL de primer C1ORO (15 µM) (Tabela 4), 0,2 µL de enzima Taq Polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase - Promega Corporation,

EUA) e água livre de DNAase e RNAase para completar 50 µL. A solução foi incubada a 94° por um minuto e depois, a 94° por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por dois minutos durante 25 ciclos e, 72°C por cinco minutos.

Tabela 4. Primes utilizados nas reações de RT-N-PCR para amplificação parcial do segmento S de OROV/ROV-like.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
S1ORO (+)	GAA GCT AGA TAC GGA CAA GTG CTC AAT GC	500
C2ORO (-)	CCA GAG TGC CTA CAG CCT C	
C1ORO (-)	CTC TTA CAG CAA CTA TCT CTT CAC G	

(+): forward; (-): reverse; pb: pares de base.

3.8.3. Amplificação parcial dos segmentos M e L

Com a finalidade de comprovar a infecção por OROV e não por um vírus resultante de recombinação deste (*OROV-like*) com outro *Orthobunyavirus*, foram feitas reações de RT-N-PCR com primers específicos para os segmentos M e L de OROV.

3.8.3.1. RT

A primeira etapa da RT foi feita com 10,5 µL de RNA viral, 2,0 µL de random primer (50 ng/µL) (Thermo Fisher, EUA) e 1,0 µL de solução de dNTP (Desoxirribonucleotídeos) (10 mM). A solução foi então incubada em termociclador Applied Biosystems (Thermo Fisher, EUA) a 65°C por cinco minutos e 4°C por cinco minutos. A segunda etapa da reação consistiu no acréscimo de 4,0 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,0 µL de DTT (Ditiotreitol) (0,1 M), 0,5 µL de inibidor de ribonuclease (RNaseOUT - Thermo Fisher, EUA) e 1,0 µL de enzima transcriptase reversa (M-MLV Reverse Transcriptase - Thermo Fisher, EUA). A solução foi então incubada a 25°C por cinco minutos, a 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

3.8.3.2. PCR com primers espécie-específicos para OROV

Na PCR do segmento M foram adicionados 5,0 µL do produto da RT, 5 µL de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL da solução de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de primer M_107_F (10 µM), 1,0 µL de primer M_935_R (10 µM) (Tabela 5), 0,2 µL de enzima Platinum Taq Polimerase (Thermo Fisher, EUA) e água livre de DNAase e RNAase para completar 50 µL. A solução foi incubada a 94° por dois minutos e depois, a 94° por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por um minutos durante 40 ciclos e, 72°C por sete minutos.

Na PCR do segmento L foram adicionados 5,0 µL do produto da RT, 5 µL de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL da solução de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de primer L_56_F (10 µM), 1,0 µL de primer L_599_R (10 µM) (Tabela 5), 0,2 µL de enzima Platinum Taq Polimerase (Thermo Fisher, EUA) e água livre de DNAase e RNAase para completar 50 µL. A solução foi incubada a 94° por dois minutos e depois, a 94° por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por um minutos durante 40 ciclos e, 72°C por sete minutos.

3.8.3.3. N-PCR com primers espécie-específicos para OROV

Na N-PCR do segmento M foram adicionados 3,0 µL do produto da PCR, 5 µL de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL da solução de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de primer M_125_F (10 µM), 1,0 µL de primer M_561_R (10 µM) (Tabela 5), 0,2 µL de enzima Platinum Taq Polimerase (Thermo Fisher, EUA) e água livre de DNAase e RNAase para completar 50 µL. A solução foi incubada a 94° por dois minutos e depois, a 94° por 30 segundos, 46°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos durante 30 ciclos e, 72°C por sete minutos.

Na N-PCR do segmento L foram adicionados 5,0 µL do produto da RT, 5 µL de tampão 10X concentrado (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL da solução de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de primer L_174_F (10 µM), 1,0 µL de primer L_599_R (10 µM) (Tabela 5), 0,2 µL de enzima Platinum Taq

Polimerase (Thermo Fisher, EUA) e água livre de DNAase e RNAase para completar 50 µL. A solução foi incubada a 94° por dois minutos e depois, a 94° por trinta segundos, 05°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos durante 30 ciclos e, 72°C por sete minutos.

Tabela 5. Primes utilizados nas reações de N-PCR para amplificação dos segmentos M e L de OROV.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
OROV_L_599_R (+)	TCA ATC CAT GGC AAT GTC ATT GT	800
OROV_L_174_F (+)	CTG CAA AYC TTG AGT AYA GAA ATG ATG	
OROV_L_56_F (+)	TTG CTC AAC CAR TAT CGR AAT AGG AT	
OROV_M_935_R (-)	CAC ATC TGT CTA GCT TTG CTT AG	
OROV_M_561_R (-)	TTG TCK AAA GCA TGC ATG GAA TT	
OROV_M_125_F (+)	GGT AAC CTY TTY AAG GAG ATG A	
OROV_M_107_F (+)	GAC CGC TGT TTY GCT GG	

(+): forward; (-): reverse; pb: pares de base.

3.9. Eletroforese em gel de agarose 1%

Géis de agarose 1%, acrescidos de brometo de etídio (Promega Corporation, EUA) na concentração de 0,00001%, foram utilizados para visualização dos produtos de PCR. Utilizou-se o tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) concentrado 10X, preparado com 108 g de tris base (Kasvi, Brasil), 55g de ácido bórico (Sigma Aldrich, EUA), 7,44 g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico (Kasvi, Brasil), dissolvidos em água ultra-pura em quantidade suficiente para completar 1L para soluções de TBE 1X. Entretanto, para a preparação do gel, utilizou-se TBE concentrado 1X, com a quantidade de agarose (Kasvi, Brasil) para atingir a concentração de 1%. Após polimerização, foram aplicados 10 µL de produto das reações de RT-N-PCR, acrescidos de marcador de corrida Blue Juice (Thermo-Fisher, EUA). Utilizou-se marcador molecular de 100 bp (Thermo-Fisher, EUA) para verificação do tamanho dos produtos de PCR. A corrida ocorreu em cuba de eletroforese (BIO-RAD, EUA), a 100 V por 60 minutos.

3.10. Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos das reações de RT-PCR foram purificados para remoção de sais e desoxinucleotídeos que podem interferir nas aplicações posteriores. Para tanto, adicionou-se acetato de sódio 3 M (pH 5,2) (V/V) e três volumes de etanol absoluto (Merck, Alemanha) a -20°C. Após homogeneização, a solução foi transferida para tubo de 1,5 mL e incubada por uma hora a -80°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 22.000 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% a -20 °C e, posterior centrifugação a 22.000 x g por 20 minutos a 4°C. O material foi colocado à temperatura ambiente sobre papel absorvente para que houvesse volatilização do etanol remanescente. Os *pellets* foram ressuspensos em 20 µL de água livre de DNAase e RNAase (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A concentração dos ácidos nucleicos foi mensurada no NanoDrop (Thermo Fisher, EUA) para otimização da reação de sequenciamento.

3.11. Marcação dos produtos de PCR para sequenciamento

Para a incorporação de fluoróforos às diferentes bases nitrogenadas dos produtos de PCR utilizou-se BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, EUA). Resumidamente, 4,0 µL de BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 2,0 µL de tampão de sequenciamento 5X, 3,2 µM de primer de interesse (Tabelas 2 e 4), o produto de PCR purificado na quantidade recomendada (1 a 20 ng, dependendo do tamanho do produto de PCR) e água livre DNAase e RNAase para completar 20 µL. Os produtos foram incubados em termociclador T100 (Bio-Rad, EUA)/ Applied Biosystems (Thermo Fisher, EUA), por 96°C por um minuto durante um ciclo, a 96°C por 10 segundos, 50°C por cinco segundos e 60°C por quatro minutos durante 25 ciclos, a 60°C por cinco minutos e mantidos a 4°C.

3.12. Purificação dos produtos de sequenciamento

Os produtos do sequenciamento foram purificados utilizando-se BigDye XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A metodologia comercial elimina reagentes do

sequenciamento como sais, corantes não incorporados e desoxinucleotídeos, prevenindo sua entrada na reação de sequenciamento. Desta forma, 4,5 μ L da solução SAM e 10 μ L da solução de BigDye X Terminator, foram adicionados a reação de BigDye. O material foi homogeneizado em agitador (Kasvi K40-10208) por 30 minutos a 19.000 x g e, ao final, foram centrifugados a 1.000 x g por dois minutos.

Alternativamente, foi utilizada metodologia não comercial para eliminação de elementos que podem prejudicar as aplicações posteriores (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As reações de BigDye foram transferidas para tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 5 μ L de EDTA (125 mM) e 60 μ L de etanol absoluto a -20°C. Os tubos foram então agitados três vezes por inversão e incubados em TA, por 15 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 19.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 60 μ L de etanol 70% a -20°C. Após nova centrifugação a 19.000 x g durante 10 minutos a 4°C e descarte do sobrenadante, o material foi protegido da luz enquanto ocorria a evaporação de qualquer solvente residual, que pudesse comprometer as aplicações posteriores. O material foi então ressuspensionado em 10 mL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA), desnaturadas a 95°C por 5 minutos e incubadas em gelo por 2 minutos, imediatamente antes da reação de sequenciamento.

3.13. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método descrito por Sanger e colaboradores (1977) em ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, EUA). A qualidade das sequências foi avaliada no Sequence Scanner Software (Applied Biosystems), no Sequencher (<http://www.genecodes.com/>) e no Accelrys Gene 2.5 (Accelrys, USA). Os eletroferogramas foram visualizados no *software* de distribuição gratuita BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3.14. Confirmação pelo BLAST

Todas as sequências obtidas no trabalho foram verificadas com Basic Local Alignment Search Tool (BLAST - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), uma ferramenta que encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas. O

programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas em bases de dados e calcula a significância estatística.

3.15. Alinhamento

O algoritmo selecionado para o alinhamento foi o de Needleman-Wunsch, implantado no *software* de distribuição gratuita MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). O mesmo é comumente utilizado em alinhamentos do tipo global, em que há comparação das sequências em toda a sua extensão. O algoritmo faz uso de um sistema de pontuação em caso de nucleotídeos iguais e diferentes, e de espaçamentos (*gaps*). Como resultado final, tem-se o alinhamento de pontuação máxima (NEEDLEMAN; WUNSCH, 1970; CHUA; FOO, 2017).

3.15.1. Dataset

Para o alinhamento foram selecionadas 33 sequências parciais do gene codificador da proteína NS5 de SLEV no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Foram escolhidas sequências representativas dos genótipos I, II, III, IV, V, VI e VII (Tabela 6). Além destas, três sequências do gene codificador da proteína NS5 de JEV, Vírus do Oeste do Nilo (WNV) e Vírus da Encefalite do Vale do Murray (MVEV). Não foi possível incluir sequências do genótipo VIII de SLEV porque há apenas sequências da região codificadora da proteína E deste depositadas no baco de dados.

Tabela 6. Sequências parciais do gene codificador da proteína NS5 de SLEV selecionadas no GenBank. São informados com número de acesso, local de origem e ano de coleta.

Vírus	Número de acesso	Local de origem	Ano
SLEV	EF158069	EUA	1972
SLEV	EF158057	Guatemala	1978
SLEV	EF158052	EUA	2001
SLEV	EF158065	EUA	1974
SLEV	EF158051	Guatemala	1969
SLEV	EF158066	EUA	1962
SLEV	EU566860	EUA	1937
SLEV	EF158061	EUA	1969
SLEV	EF158070	EUA	1933
SLEV	EF158049	EUA	1955
SLEV	EF158059	México	1965
SLEV	EF158055	EUA	1962
SLEV	EF158062	EUA	1979
SLEV	EF158050	EUA	1975
SLEV	EF158058	EUA	1988
SLEV	KM267635	Brasil/Belém	1978
SLEV	FJ753287	Argentina	1978
SLEV	FJ753286	Argentina	2005
SLEV	EF158064	Panamá	1973
SLEV	EF158053	Brasil	1973
SLEV	EF158048	Brasil	1960
SLEV	EF158060	Panamá	1983
SLEV	EF158056	Trinidad	1955
SLEV	EF158068	Argentina	1967
SLEV	EF158063	Argentina	1966
SLEV	AY632544	Argentina	1966
SLEV	JQ957869	México	2008
SLEV	JQ957868	Mexico	2008
SLEV	KJ957827	Brasil/Cuiabá	2013

Continua

Vírus	Número de acesso	Local de origem	Ano
SLEV	KJ528400	Brasil/Ribeirão Preto	2008
SLEV	DQ836337	Brasil/São José do Rio Preto	2006
SLEV	DQ836336	Brasil/São José do Rio Preto	2006
SLEV	EF219166	Brasil/São José do Rio Preto	2006
JEV	KR265316	China	-
MVEV	KC852192	Austrália	2012
WNV	KX547621	EUA	2004

JEV: Vírus da Encefalite Japonesa; MVEV: Vírus da Encefalite do Vale do Murray; SLEV: Vírus da Encefalite de Saint Louis; WNV: Vírus do Oeste do Nilo.

Já para o alinhamento das sequências de OROV/*OROV-like*, foram selecionadas 41 sequências de parte do segmento S de *Orthobunyavirus* do sorogrupo do vírus Simbu (Tabela 7).

Tabela 7. Sequências de parte do segmento S de *Orthobunyavirus*, entre eles OROV e *OROV-like*, selecionadas no GenBank. São informados com número de acesso, local de origem e ano de coleta.

Vírus	Número de Acesso	Local de origem	Ano
Anopheles A	KY793539	Colômbia	1940
Anopheles B	NC_038721	Colômbia	-
Nola	AM711134	Nola	1970
Bunyamwera	KP063900	Argentina	2013
Bwamba	NC_034480	Uganda	1937
California encephalitis	KX817314	EUA	1943
Capim	NC_034483	Brasil	1958
Gamboa	MG019913	Brasil	1985
Caraparu	MH052061	Brasil	1956
Marituba	NC_034496	Brasil	1954
Madrid	NC_034498	Panamá	1956
Oriboca	NC_034476	Brasil	1954
Guama	NC_038737	Brasil	1955
Koongol	NC_038743	Austrália	1960
Iquitos	KF150536	Peru	1999
Jatobal	JQ675601	Brasil	1984
Oya	KY795950	Índia	1986
Akabane	KY385908	China	2016
Tinaroo	MH484341	Austrália	1978
Nyando	NC_034481	Quênia	1959
Patois	MH017273	México	1963
Oropouche	KP691605	Brasil	2009
Madre de Dios	KF697146	Peru	2007
Perdões	KP691626	Brasil	2012
Douglas	HE795092	-	-
Sathuperi	NC_018462	-	-
Shamonda	NC_018464	-	-
Peaton	MH484320	Austrália	1976
Aino	M22011	-	-

Continua

Vírus	Número de Acesso	País	Ano
Shuni	KU937313	Israel	2014
Simbu	NC_018477	-	-
Schmallenberg	KC355459	Holanda	2011
Tete	KM972721	África do Sul	1959
Umbre	KP792685	Índia	1975
Tucunduba	JN572079	Brasil	1955
Kaeng Khoi	MF170064	China	2012
Cat Que	NC_024075	Vietnã	2004
Manzanilla	KF697148	Trinidad e Tobago	1954
Utive	KF697158	Panamá	1975
Utinga	KF697156	Brasil	1965
Facey's Paddock	KF697136	Austrália	1974

3.16. Análise Filogenética

A reconstrução filogenética foi feita no *software* de distribuição gratuita MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>). O método estatístico escolhido foi o de Máxima Verossimilhança. Considerando o alinhamento, diferentes árvores filogenéticas são construídas a partir da comparação entre as sequências. Ao final, é dada a árvore consenso, a qual representa o evento mais provável de ter ocorrido na realidade (CALDART et al., 2016, FELSENSTEIN, 1981). Como critério de confiabilidade, foi utilizado o método de *Bootstrap* para 1000 réplicas (MCCORMACK; CLEWLEY, 2002).

A árvore foi editada no FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). O programa possui uma interface gráfica que permite a modificação vários componentes desta, garantindo uma melhor visualização.

4. Resultados

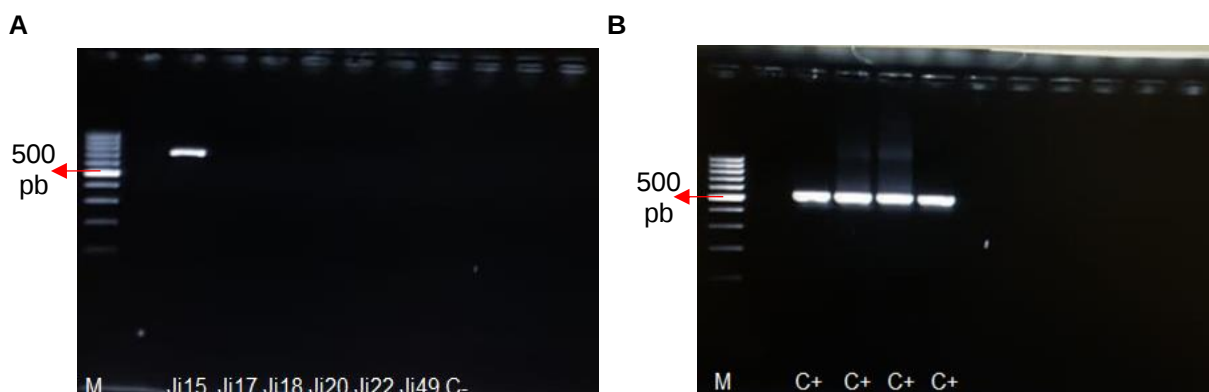
4.1. Isolamento Viral

Foram realizadas duas passagens em cultura celular das amostras Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49 para o isolamento viral.

4.1.1. Primeira passagem

Para a confirmação do isolamento na primeira passagem das amostras Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49, foi realizada a amplificação parcial do segmento S de OROV/OROV-like (Figura 5).

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose para confirmação de isolamento viral na primeira passagem. Foi feita a PCR para amplificação parcial do segmento S de OROV/OROV-like nas amostras Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22, Ji49 (A) e nos controles positivos (B). C-: controle negativo; C+: controles positivos; M: marcador de peso molecular (100pb).

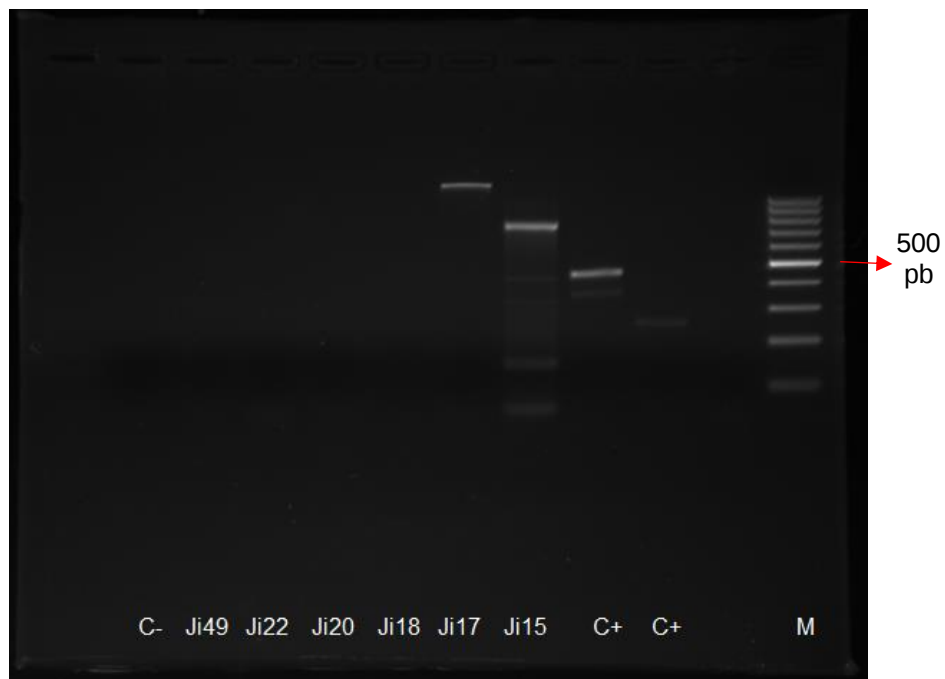


Não houve amplificação nas amostras Ji17, Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49. A banda resultante do fragmento amplificado na amostra Ji15 não aparece na altura de 500pb no gel de agarose, conforme previsto na Tabela 4, não indicando a positividade para OROV/OROV-like.

4.1.2. Segunda passagem

Na segunda passagem das amostras Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49, foi realizada novamente a amplificação parcial do segmento S de *OROV/OROV-like* (Figura 6).

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para confirmação de isolamento viral na segunda passagem. Foi feita a PCR para amplificação parcial do segmento S de *OROV/OROV-like* nas amostras Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22, Ji49 e nos controles positivos. C-: controle negativo; C+: controle positivo; M: marcador de peso molecular (100pb).

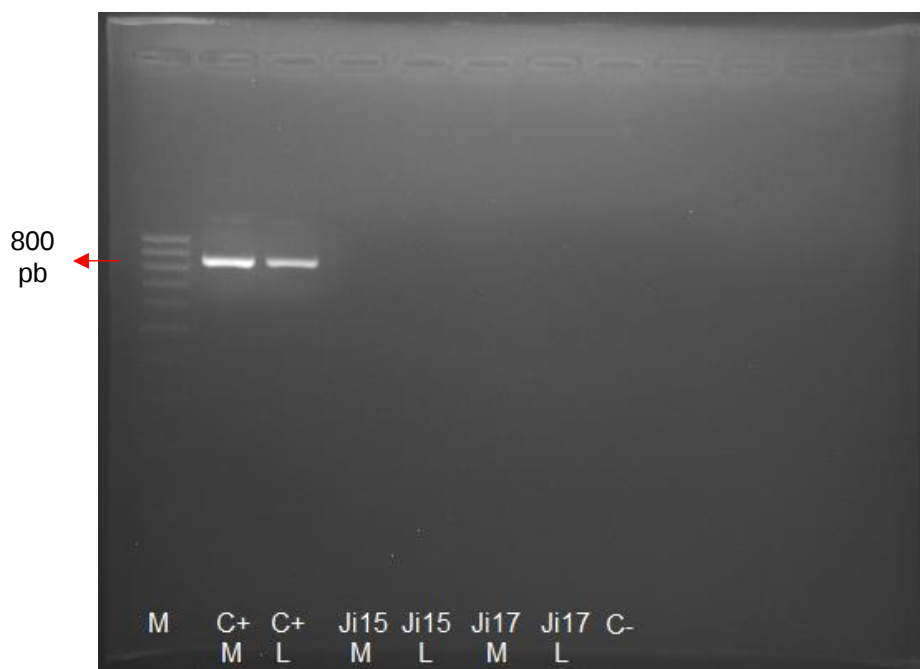


Não houve amplificação nas amostras Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49. A banda que corresponde ao fragmento amplificado na amostra Ji15 aparece na mesma altura observada na Figura 6. Entretanto, além dela, também foi observada a banda de amplificação da amostra Ji17.

4.1.3. Amplificação parcial dos segmentos M e L de OROV

Foi realizada a amplificação parcial dos segmentos M e L de OROV da segunda passagem do isolamento viral das amostras Ji15 e Ji17 para a comprovação do ensaio (Figura 7).

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para confirmação de isolamento viral na segunda passagem. Foi feita a PCR para amplificação dos segmentos M e L de OROV nas amostras: Ji15, Ji17, Ji18, Ji20, Ji22 e Ji49. C-: controle negativo; C+ M: controle positivo para segmento M; C+ L: controle positivo para segmento L; M: marcador de peso molecular (100pb).

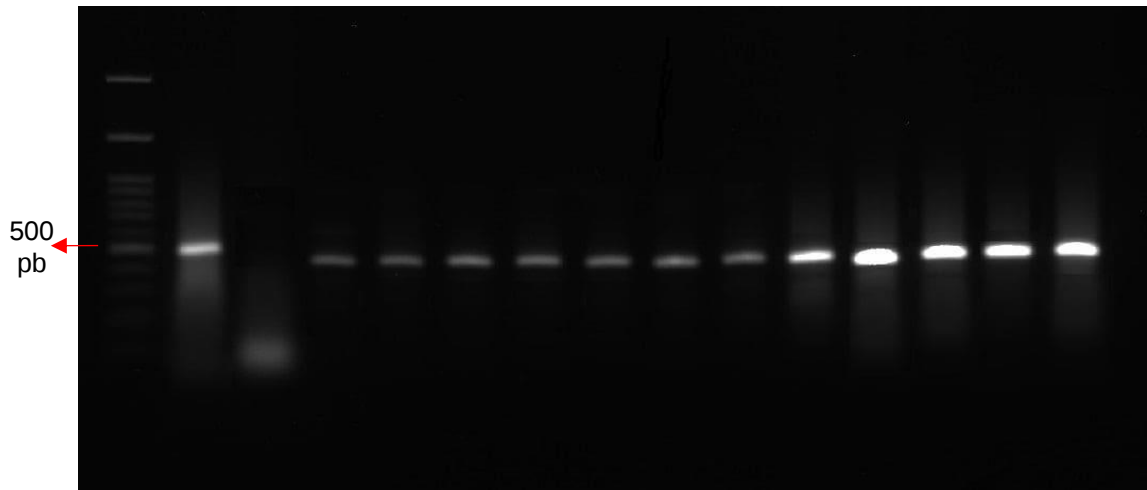


O aparecimento de bandas na altura de 800bp nos controles positivos indica a amplificação parcial dos segmentos M e L de OROV, porém, não houve amplificação dos mesmos na segunda passagem das amostras Ji15 e Ji17 (Figura 7), indicando que não houve sucesso no isolamento viral destas amostras, não sendo possível realizar o sequenciamento e a análise filogenética.

4.2. Confirmação prévia da presença de arbovírus

A confirmação prévia da presença de OROV/*OROV-like* em 11 das 13 amostras utilizadas neste estudo pode ser observada por meio da amplificação parcial do segmento S (Figura 8).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* de parte do segmento S de OROV/OROV-like obtidos via PCR. Amostras: Ji13, Ji14, Ji15, Ji16, Ji17, Ji18, Ji19, Ji20, Ji22 e Ji49; C-: controle negativo; C+: controle positivo; M: marcador de peso molecular (100pb).



4.3. Sequenciamento parcial da região codificadora da proteína NS5 de SLEV

O sequenciamento dos produtos das reações de PCR de SLEV detectados nas cinco amostras analisadas neste trabalho gerou fragmentos de tamanhos diferentes (Tabela 8).

Tabela 8. Tamanho dos *amplicons* de SLEV obtidos a partir do sequenciamento dos produtos de PCR encontrados nas amostras do estudo. São informados com número de acesso após depósito no GenBank, local origem e tipo de amostra.

Identificação	Número de Acesso	Local de origem	Tipo de amostra	Amplicon (pb)
H278	MK341488	Araraquara	Soro	216
H279	MH709110	Sinop	Soro	441
H815	MH709111	Sinop	Soro	186
H835	MH709112	Sinop	Soro	844
Ar17	MH709113	Sinop	Pool de mosquitos fêmea <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i>	186

pb: pares de base.

4.4. Sequenciamento parcial do segmento S de OROV/OROV-like

O sequenciamento dos produtos de N-PCR de OROV/OROV-like detectados nas 13 amostras analisadas também gerou fragmentos de tamanhos diferentes (Tabela 9).

Tabela 9. Tamanho dos *amplicons* de OROV/OROV-like obtidos a partir do sequenciamento dos produtos de N-PCR encontrados nas amostras do estudo. São informados com local de origem e tipo de amostra.

Identificação	Local de origem	Tipo de amostra	Amplicon (pb)
Ji04	Ji-Paraná	Soro	494
Ji12	Ji-Paraná	Soro	494
Ji13	Ji-Paraná	Soro	637
Ji14	Ji-Paraná	Soro	488
Ji15	Ji-Paraná	Soro	496
Ji16	Ji-Paraná	Soro	495
Ji17	Ji-Paraná	Soro	490
Ji18	Ji-Paraná	Soro	490
Ji19	Ji-Paraná	Soro	492
Ji20	Ji-Paraná	Soro	504
Ji22	Ji-Paraná	Soro	495
Ji45	Ji-Paraná	Soro	482
Ji49	Ji-Paraná	Soro	485

pb: pares de base.

4.5. Confirmação pelo BLAST

O alinhamento promovido pela ferramenta BLAST confirmou o sequenciamento dos cinco fragmentos parciais da região codificadora da proteína NS5 de SLEV ao identificar similaridade com outras sequências depositadas no GenBank (Tabela 10).

Tabela 10. Sequências identificadas pelo BLAST que confirmam o sequenciamento de fragmentos de parte da região codificadora da proteína NS5 de SLEV. São informados número de acesso, local de origem e variação da porcentagem de similaridade entre todas as sequências do trabalho.

Vírus	Número de acesso	Local de origem	Similaridade entre todas as sequências (%)
SLEV	MH939175	Brasil	99,77 – 100,00
SLEV	KM267635	Brasil	99,77 – 100,00
SLEV	KJ528400	Brasil	99,71 – 100,00
SLEV	EF158053	Brasil	98,40 – 98,70
SLEV	EU088424	Brasil	98,38 – 98,69

Através do alinhamento feito pela ferramenta BLAST também foi possível confirmar o sequenciamento parcial dos 13 fragmentos do segmento S de OROV/*OROV-like* por meio da comparação com outras sequências no GenBank (Tabela 11).

Tabela 11. Sequências identificadas pelo BLAST que confirmam o sequenciamento de fragmentos de parte do segmento S de OROV/*OROV-like*. São informados número de acesso, local de origem e variação da porcentagem de similaridade entre todas as sequências do trabalho.

Vírus	Número de acesso	Local de origem	Similaridade entre todas as sequências (%)
OROV	EU561644	Brasil	90,13 – 98,70
OROV	KP052852	Brasil	98,92 – 90,02
OROV	AY704560	Brasil	98,67 – 88,91
OROV	HQ830467	Brasil	98,67 – 88,91
OROV	MG747545	Brasil	98,26 – 89,36

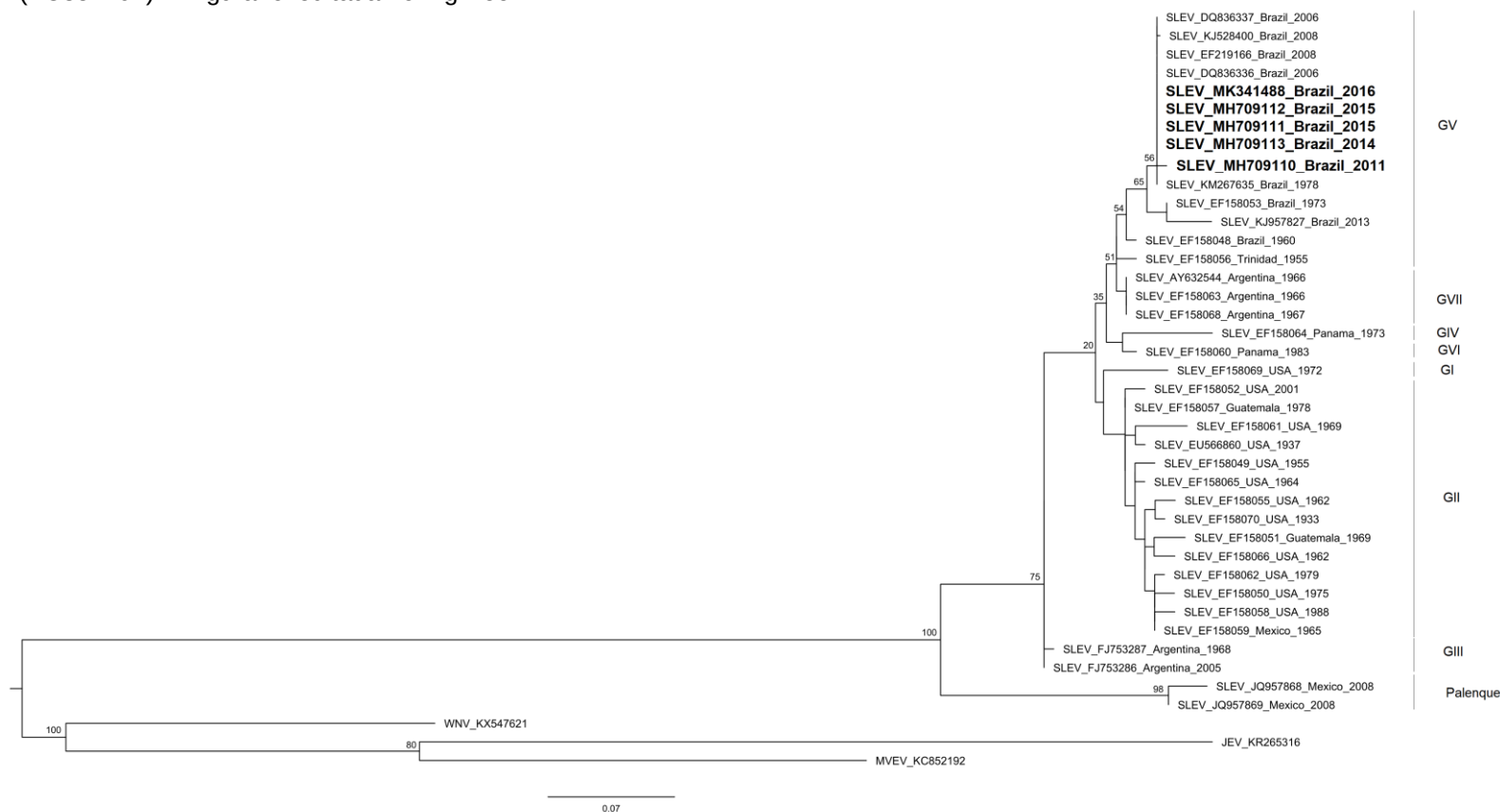
4.5. Análise Filogenética

O modelo evolutivo selecionado com base no alinhamento pelo *software* de acesso livre jModelTest 2 (<https://github.com/ddarriba/jmodeltest2>) (DARRIBA et al., 2012; TAVARÉ, 1986) foi o GTR (General Time Reversible). Modelos como este constituem a base da análise evolutiva em nível molecular porque têm o papel de

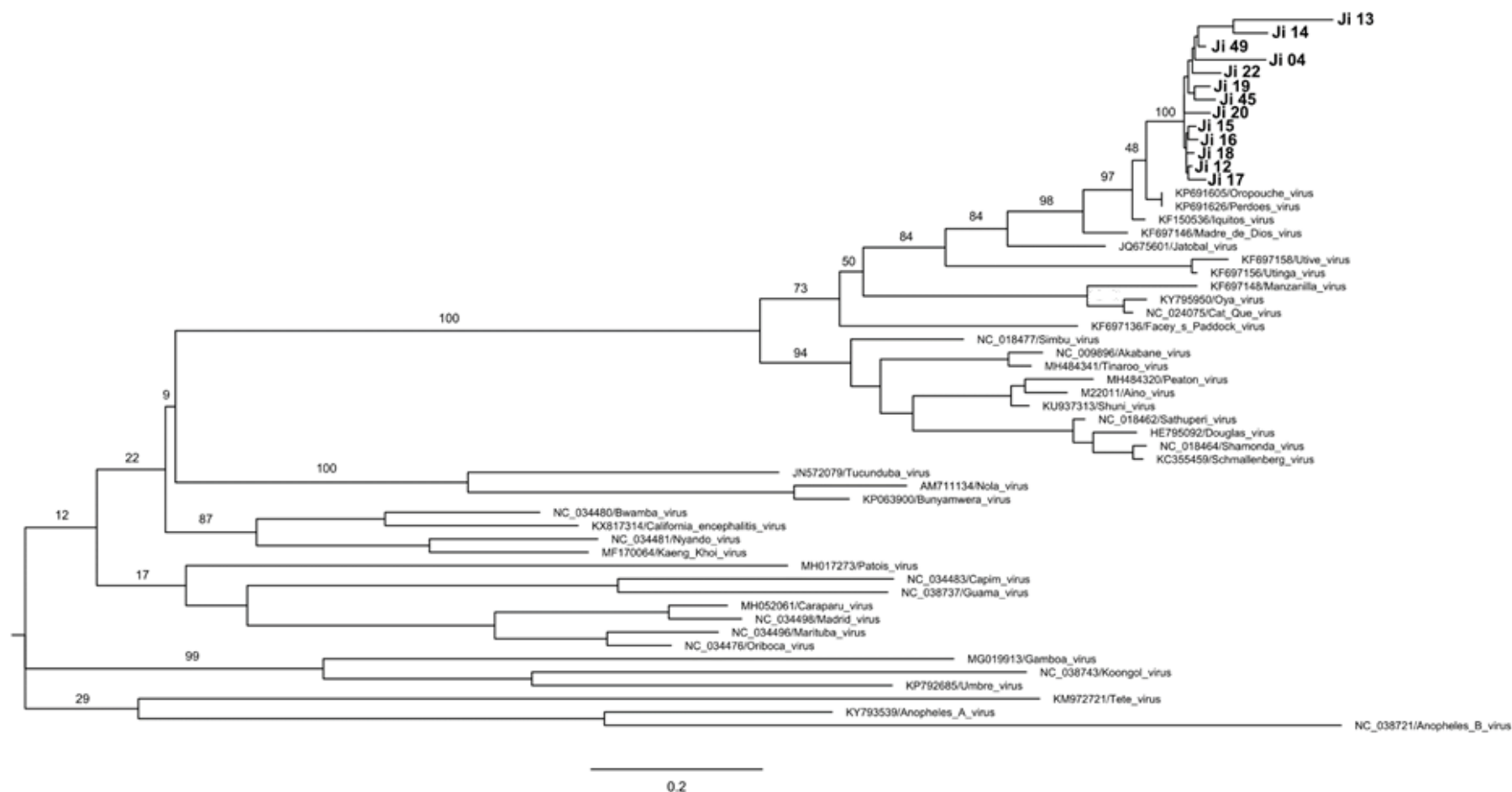
descrever as taxas de mudanças de mutações fixas observadas ao longo de sequências. O GTR assume diferentes taxas para cada mutação e diferentes frequências para os nucleotídeos (ARENAS, 2015).

A reconstrução filogenética com as sequências parciais da região codificadora da proteína NS5 de SLEV coletadas em Araraquara (SP) e Sinop (MT) sugere que todas pertencem ao genótipo V do vírus (Figura 9). No clado, estão outras sequências que foram isoladas no Brasil (DQ836337, KJ528400, EF219166, KM267635, EF158053, KJ957827, EF158048) e uma em Trinidad (EF158056). Logo abaixo do clado do genótipo V estão dispostos os clados do genótipo VII, com sequências Argentinas (AY632544, EF158063, EF158068), dos genótipos IV e VI, com sequências do Panamá (EF158064, EF158060), dos genótipos I e II, com sequências de países da América do Norte e Central (EF158069, EF158052, EF158057, EF158061, EU566860, EF158049, EF158065, EF158065, EF158070, EF158051, EF158066, EF158062, EF158050, EF158058, EF158059) e do Palenque, com sequências Mexicanas (JQ957869, JQ957868). No grupo externo, são observadas sequências de outros *Flavivirus* causadores de encefalite: WNV (KC852192), JEV (KR265316) e MVEV (KX547621).

Figura 9. Análise Filogenética de SLEV, conduzida no MEGA7. O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo jModelTest 2 foi o General Time Reversible (GTR). O método estatístico de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) foi utilizado para a construção da árvore. Os valores de *Bootstrap* (0 – 100) para mil réplicas são dados em porcentagem e encontram-se acima dos ramos. A árvore é composta por 38 sequências, de 186 nucleotídeo, que compreendem parte do gene codificador da proteína NS5 de SLEV. Estas estão classificadas entre os genótipos I – VII (GI – GVII) e Palenque. As sequências analisadas no trabalho estão em negrito. O grupo externo é formado por três sequências de *Flavivirus*: WNV (KX547621), JEV (KR265316) e MVEV (KC852192). A figura foi editada no FigTree.



Na reconstrução filogenética de parte do segmento S de *Orthobunyavirus* é possível observar que as sequências dos vírus do sorogrupo Simbu ficaram dispostas no mesmo clado (Schmallenberg, Samonda, Douglas, Sathuperi, Shuni, Aino, Peaton, Tinaro, Akabane, Simbu, Facey's Paddock, Cat Que, Oya, Manzanilla, Utinga, Uti, Oropouche e *Oropouche-like*) (Figura 10). Um dos clados que formam o clado do sorogrupo é o de OROV, em que está a sequência representativa do vírus (KP691605), outras de *OROV-like viruses*, e onde ficaram as sequências coletadas em Ji-Paraná (RO). Os *OROV-like viruses* são PERDV (KP691626), IQTV (KF150536), MDDV (KF697146) e JATV (JQ675601). Mais abaixo encontra-se o clado com outros *Orthobunyavirus* que não pertencem ao sorogrupo Simbu (Tucunduba, Nola, Bunyamwera, Bwamba, Encefalite da Califórnia, Nyando, Kaeng khoi, Patois, Capim, Guama, Caraparu, Madrid, Marituba, Oriboca, Gamboa, Koongol, Ubre, Tete, Anopheles A e Anopheles B).



5. Discussão

A emergência de CHIKV e ZIKV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; MLAKAR et al., 2016), e mais recentemente a reemergência do YFV silvestre (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a), chamam a atenção para a problemática de saúde pública envolvendo os arbovírus. O aumento da densidade populacional (BRAACK et al., 2018), da infestação dos vetores (FERREIRA; CHIARAVALLLOTI NETO; MONDINI et al., 2018), a intensificação do comércio internacional e as mudanças climáticas contribuem para a dispersão dos mesmos pelo mundo todo (CAMPBELL-LENDRUM et al., 2015). A grande biodiversidade, tanto animal quanto vegetal, e a presença de variados biomas (IBGE 2019b) favorecem a circulação de diferentes arbovírus no Brasil (FIGUEIREDO et al., 2000). Este trabalho revelou a circulação de SLEV e OROV/*OROV-like* em três municípios brasileiros onde já havia um histórico de circulação de DENV, CHIKV e ZIKV. Considerados menos comuns, SLEV, OROV e *OROV-like virus* podem estar se dispersando silenciosamente pelo país, tendo potencial para atravessarem fronteiras.

A região do genoma dos *Flavivirus* que compreende a proteína E é conhecida por ser uma das mais antigênicas, uma vez que é responsável pela entrada desses arbovírus na célula hospedeira (BRIEN, 2010; YU et al., 2013; ZHANG et al., 2017). Com o objetivo de avaliar a conservação das proteínas ao longo de sua evolução, um estudo feito com WNV mostrou que as que menos sofreram variação, em termos de aminoácidos, foram as não-estruturais. Esta diferença na conservação das proteínas não-estruturais frente às estruturais pode ser atribuída à necessidade de manutenção das funções das primeiras e à necessidade de adaptação das segundas às respostas ao sistema imune do hospedeiro (KOO et al., 2009). As sequências utilizadas no presente trabalho compreenderam parte do gene codificador da proteína NS5 de SLEV.

SLEV é classificado em oito genótipos (I – VIII) com base em análises de sequências da região codificadora da proteína E, e de seu genoma completo (KRAMER; CHANDLER, 2001; VEDOVELLO et al., 2015). O DENV, normalmente, também é agrupado em genótipos com base no gene E, porém, a região que compreende o gene da NS5 também é utilizada para determinar

genótipos circulantes do vírus (DAVIDSON et al., 2009; FULOP et al., 1993; MONDINI et al., 2009). Árvores filogenéticas de sequências da proteína NS5 de SLEV apresentam topologias similares às construídas com sequências da proteína E e do genoma completo (KOPP et al., 2013). A análise conduzida no estudo foi utilizada a fim de determinar o genótipo de SLEV que circulou em Araraquara (SP) e Sinop (MT), com base na comparação de sequências representativas de sete (I – VII) genótipos do vírus. O genótipo VIII não foi incluído em razão da indisponibilidade de sequências da região codificadora da NS5 do mesmo no GenBank.

A reconstrução filogenética sugere que as sequências de SLEV deste estudo pertencem ao genótipo V. Entre os genótipos que circulam no Brasil, o mesmo parece ser o mais prevalente. A primeira detecção foi em um mosquito da espécie *Culex declarator*, no ano de 1964 em Belém (PA). Até a década de 1980, sua circulação ficou restrita a estado da região amazônica em animais sentinela (RODRIGUES et al., 2010). Em 2006 ocorreu o primeiro surto causado por SLEV em São José do Rio Preto (SP), atribuído ao genótipo V (MONDINI et al 2007a, TERZIAN et al., 2011). Em 2008, foi detectado em uma paciente com suspeita de dengue em Ribeirão Preto (SP), a 89 km de distância de Araraquara (SP) (MAIA et al., 2014). Um cavalo que desenvolveu encefalite teve o genótipo V isolado de seus tecidos em Belo Horizonte (MG), no ano de 2013 (ROSA et al., 2013). Em 2015, foi isolado em mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* em Cuiabá (MT) localizada a 482 km de Sinop (MT) (HEINEN et al, 2015). A confirmação da circulação do genótipo V em diferentes estados, de diferentes regiões ao longo de anos, reforça sua disseminação silenciosa pelo Brasil.

Além do genótipo V de SLEV, a circulação de outros três já foi descrita no Brasil. O genótipo II foi isolado em 1968 na cidade de São Paulo (SP), de um roedor (*Akodon sp*) (KRAMER; CHANDLER, 2001). O genótipo III foi detectado em uma paciente febril com suspeita de dengue em 2004, também em São Paulo (SP) (dos SANTOS et al., 2006). E o genótipo VIII foi detectado pela primeira vez em uma ave (*Myrmotherula huxwelli*), no ano de 1964, em Belém (PA). De acordo com análises temporais, os primeiros genótipos a serem introduzidos no Brasil foram os genótipos VIII e V, entre 1937 e 1950 (RODRIGUES et al., 2010). Não é possível afirmar quando ocorreu a entrada

do genótipo V de SLEV no Mato Grosso, mas este trabalho trouxe evidências de sua circulação desde 2011 no estado. Em São Paulo, sua introdução provavelmente ocorreu em meados de 2004, depois da chegada dos genótipos II e III, mas antes de provocar o primeiro surto no país, em 2006.

YFV (MOREIRA-SOTO et al., 2018) é mantido na natureza através de seu ciclo silvestre. Nos últimos anos o Brasil se deparou com um aumento do número de casos de febre-amarela silvestre em zonas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a), o que possivelmente ocorreu devido a presença do mosquito *Aedes aegypti* nestas áreas (COUTO-LIMA et al., 2017). Um estudo conduzido no Vale do Ribeira, região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, revelou uma elevada prevalência para anticorpos anti-SLEV entre as aves analisadas ao longo de 12 anos (FERREIRA et al., 1994). A circulação de SLEV no Brasil pode estar sendo garantida graças ao seu ciclo silvestre e sua eventual transmissão no ambiente urbano pode ocorrer em locais onde há a presença de vetores competentes.

Menos de 1% das infecções causadas por SLEV são sintomáticas (CDC, 2018). Estudos apontam a importância de pacientes que não apresentam sintomas para a dispersão dos arbovírus. Caso haja um vetor competente e este hospedeiro apresente viremia suficiente, o vírus pode acabar circulando de forma silenciosa, e assim se propagar para locais onde ainda não foi encontrado (CHASTEL et al., 2012; DUONG et al., 2015). Casos de infecção por SLEV podem estar sendo subnotificados em todo o Brasil, uma vez que o presente trabalho detectou a presença do vírus durante períodos de ocorrência de epidemias de DENV (CVE, 2019; GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO, 2016 – 2017).

A migração humana também apresenta papel importante na disseminação dos arbovírus. A detecção de SLEV em Araraquara (SP) e em Sinop (MT), cidades que estão há mais de 1.700 km de distância uma da outra, sugere que o movimento humano pode ter contribuído para sua dispersão. A vinda de indivíduos de diferentes países para o Brasil, principalmente devido a eventos internacionais, foi considerada a porta de entrada para o ZIKV no país; o mesmo pode acontecer com outros arbovírus (MASSAD et al., 2017).

O fato de OROV ter o seu material genético dividido em três segmentos favorece a ocorrência de recombinação gênica entre ele e outros vírus do

sorogrupo Simbu. O recombinante pode ter uma mistura variada dos segmentos S, M e L dos vírus que o geraram (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Os segmentos L e S são aqueles mais trocados entre as espécies e, normalmente, são herdados em conjunto (PINHEIRO et al., 1981b). As glicoproteínas codificadas pelo segmento M são mais susceptíveis a mutações, ao contrário das proteínas N e L, codificadas nos segmentos S e L, respectivamente, o que pode estar relacionado com a variedade de segmentos M nos *OROV-like*. A recombinação gênica pode ter consequências impactantes, visto que pode resultar na emergência de um vírus mais patogênico (TISLTON- LUNEL et al., 2015; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Este trabalho mostra que no ano de 2013 houve circulação de OROV ou de *OROV-like* no município de Ji-Paraná (RO).

A identificação de OROV tornou-se um desafio com o surgimento dos *OROV-like*. Atualmente, as metodologias de detecção de OROV disponíveis são baseadas, majoritariamente, na detecção do segmento S, o qual é considerado o mais trocado quando ocorre recombinação gênica (SAEED et al., 2000; TERZIAN et al., 2011). Devido à limitação causada pelo fenômeno, a análise filogenética tornou-se uma importante ferramenta para distinguir OROV de seus recombinantes. A partir do sequenciamento dos genomas completos de OROV e de *OROV-like*, são feitas análises de seus três segmentos, e a única em que há formação de clados separados para os dois tipos de vírus é a análise do segmento M (TISLTON- LUNEL et al., 2015). Neste estudo, a intenção de se realizar a análise filogenética parcial dos três segmentos de OROV/*OROV-like* foi para promover a diferenciação entre estes vírus.

Na análise filogenética, as sequências de Ji-Paraná (RO) ficaram dispostas no mesmo clado que as de OROV, PERDV, IQTV, MDDV E JATV (Figura 10). O fato de o segmento S de OROV ser herdado pelos *OROV-like* limita a utilização do mesmo para detectar o vírus. Todavia, Acrani e colaboradores (2015) mostraram recentemente que o segmento S de OROV pode ser 200 nucleotídeos maior do que se pensava, reforçando a necessidade de padronização de metodologias de detecção de OROV através amplificação deste segmento.

A circulação de OROV estava restrita a estados do Norte e ao Maranhão (SAEED et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2009) até meados de 2011-2012, quando o mesmo se dispersou para a região Centro-Oeste (CARDOSO et al., 2015). No ano 2000 a presença de OROV foi detectada em um macaco (*Callithrix sp.*), na região Sudeste (TEIXEIRA NUNES et al., 2005). Nos últimos anos, casos importados de infecção por OROV em humanos foram confirmados no interior de São Paulo (DE SOUZA LUNA et al., 2017), inclusive com o agravante de complicações neurológicas (VERNAL; MARTINI; DA FONSECA, 2019). Apenas as amostras Ji15 e Ji17, após isolamento viral, passaram pela reação de amplificação dos segmentos M e L com primers específicos para OROV. No entanto, não foi possível observar o aparecimento de bandas na eletroforese em gel de agarose (Figura 7), impossibilitando a realização da análise filogenética para a diferenciação dos vírus entre OROV e *OROV-like*.

O isolamento de vírus resultantes de recombinação de OROV (*OROV-like*) no Brasil e em países vizinhos, compromete inferir que o vírus que circulou no município de Ji-Paraná (RO) em 2013 tratava-se realmente de OROV. O primeiro *OROV-like* descrito, JATV, foi detectado em um quati (*Nasua nasua*) em 1985, no estado do Pará – Brasil (SAEED et al., 2001). Em 1999 e 2007, respectivamente, IQTV (AGUILAR et al., 2011) e MDDV (LADNER et al., 2014) foram detectados em pacientes com doença febril no Peru. No ano de 2010, MDDV também foi isolado de um macaco (*Cebus olivaceus Schomburgk*) numa floresta da Venezuela (NAVARRO et al., 2016). E em 2015, PERDV foi isolado de um primata não-humano (*Callithrix sp.*) no estado de Minas Gerais – Brasil (TISLTON- LUNEL et al., 2015).

A proliferação dos vetores de arbovírus acontece com o aumento de seus criadouros, o que ocorre principalmente nos períodos chuvosos. A elevação dos casos de dengue no Brasil se dá entre janeiro e junho, período que coincide com as estações chuvosas (FERREIRA; CHIARAVALLOTTI NETO; MONDINI et al., 2018; VIANA; IGNOTTI, 2013). A maioria das epidemias causadas por OROV também ocorre neste período (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 2004), outro fator que poderia estar fazendo com que infecções causadas por OROV estejam sendo atribuídas ao dengue, principalmente nos estados da região norte do país.

A diminuição da carga viral em amostras provenientes de diferentes fontes é um grande obstáculo quando se trata de diagnóstico molecular, sequenciamento e posterior análise filogenética. O mais indicado é que a amostra seja utilizada logo após a coleta, porque pode ocorrer diminuição de carga viral assim que a mesma é congelada (HOSSEINI et al., 2016). Também é indicada a separação de alíquotas, a fim de se evitar o descongelamento repetitivo, que gradativamente vai promovendo a diminuição de carga viral (CUHADAR et al., 2013; KRAJDEN et al., 1999). O transporte das amostras de Sinop (MT) e Ji-Paraná (RO) até Araraquara (SP), onde foram manipuladas, sem um controle adequado de temperatura, pode ter contribuído para diminuição da carga viral e eventuais problemas no decorrer do estudo.

Apesar de todas as amostras analisadas no presente trabalho serem provenientes de áreas urbanas, Ji-Paraná (RO) está localizada no bioma da Amazônia, local comum de circulação de arbovírus (FIGUEIREDO et al., 2000). Já Araraquara (SP) e Sinop (MT), estão em áreas de transição: Sinop entre Cerrado e Amazônia, Araraquara entre Mata Atlântica e Cerrado. Estas zonas têm grande importância epidemiológica, uma vez que são habitat de vetores e de seus hospedeiros, sendo a interface entre aglomerados humanos e ecossistema natural (BRADLEY, 2004).

Todos os pacientes cujos soros foram analisados neste trabalho foram clinicamente diagnosticados com DENV. No Brasil, há programas de vigilância para o vírus, como também para ZIKV e CHIKV. Conforme o Ministério da Saúde, a confirmação laboratorial dos casos é feita através de sorologia (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA), que deve ser realizada depois de pelo menos seis dias do início dos sintomas do doente, ou da detecção de antígenos virais (NS1, PCR e isolamento viral), realizada até o quinto dia do início dos sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; 2017b; 2019b). Outra questão importante é a sintomatologia inicial similar provocada pelas doenças, que também dificulta a identificação precisa do arbovírus causador (FIGUEIREDO, 2000). Em razão destes fatores, é importante que haja programas de vigilância voltados para arbovírus tal qual SLEV, OROV e *OROV-like*. IQTV, PERDV, MDDV e JATV podem se estabelecer no Brasil pela proximidade de origem.

A circulação de SLEV e de OROV/*OROV-like* reforça que diferentes arbovírus estão presentes no Brasil. É preciso que sejam desenvolvidos métodos eficientes de detecção de OROV e de *OROV-like viruses*, principalmente onde há co-circulação destes, e que casos de SLEV sejam corretamente diagnosticados, uma vez que o vírus vem se dispersando de forma silenciosa pelo país.

6. Conclusões

1. A região do genoma de *Flavivirus* que compreende a proteína NS5 mostrou-se adequada na determinação de genótipos de SLEV.

2. A análise filogenética das sequências de SLEV revelou que genótipo V estava circulando nos municípios de Araraquara (SP) e Sinop (MT) entre 2011 e 2016.

3. As metodologias disponíveis de detecção de OROV por meio da amplificação do segmento S não são capazes de diferenciá-lo de *OROV-like viruses*, havendo a necessidade da utilização de metodologias adicionais para sua detecção.

4. Houve a circulação de um vírus OROV/*OROV-like* em Ji-Paraná (RO) no ano de 2013, mas não foi possível definir exatamente qual.

5. É imprescindível que a vigilância de arbovírus no Brasil inclua vírus como SLEV, OROV e *OROV-like*, já que o estudo mostra que circularam em meio a locais onde há circulação de DENV, CHIKV e ZIKV.

7. Referências Bibliográficas

ACRANI, G. O. et al. Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. **Journal of General Virology**, v. 96, Pt. 3, p. 513-526, 2015.

AGUILAR, P. V. et al. Iquitos virus: A novel reassortant orthobunyavirus associated with human illness in Peru. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, 2011.

ANDERSON, C. R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 574-8, 1961.

ARENAS, M. Trends in substitution models of molecular evolution. **Frontiers in Genetics**, v. 6. ID 319, 2015.

ARIZA, A. et al. Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 11, p. 5912-26, 2013.

AUGUSTE, A. J.; PYBUS, O. G.; CARRINGTON, C. V. F. Evolution and dispersal of St. Louis encephalitis virus in the Americas. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 709–715, 2009.

AZEVEDO, R. D. S. D. S. et al. Reemergence of Oropouche fever, Northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 912–915, 2007.

BAILLIE, G. J. et al. Phylogenetic and evolutionary analyses of St. Louis encephalitis virus genomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 717–728, 2008.

BAISLEY, K. J. et al. Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonian Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 5, p. 710–716, 1998.

BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, 2016, v. 56, n. 7, p. 1684–1688.

BASTOS, Mde S. et al. Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 732-5, 2012.

BATISTA, P. M. et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684–690, 2013.

BERANEK, M. D. et al. First detection of *Mansonia titillans* (Diptera: Culicidae) infected with St. Louis encephalitis virus (Flaviviridae: Flavivirus) and Bunyamwera serogroup (Peribunyaviridae: Orthobunyavirus) in Argentina. **Journal of Vector Ecology**, v. 43, n. 2, p. 340-343, 2018.

BLATTNER, R. J.; HEYS, F. M. St. Louis Encephalitis: Occurrence in Children in St. Louis Area During Nonepidemic Years 1939-1944. **JAMA**, v. 129, p. 854-857, 1945.

BRAACK, L. et al. Mosquito-borne arboviruses of African origin: Review of key viruses and vectors. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1. ID 29, about 26 p., 2018.

BRADLEY, D. J. An exploration of chronotones: a concept for understanding the health processes of changing ecosystems. **EcoHealth**, v. 1, n. 2, p. 165–171, 2004.

BRIEN, J. D. Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against Dengue virus type 3. **Journal of Virology**, v. 84, n.20, p. 10630–10643, 2010.

BRIESE, T.; CALISHER, C. H.; HIGGS, S. Viruses of the family Bunyaviridae: Are all available isolates reassortants? **Virology**, v. 446, n. 1–2, p. 207–216, 2013.

BRODY, J. A.; BROWNING, G. Epidemic of St. Louis Encephalitis in Cameron County, Texas, in 1957. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 9, p. 436-443, 1960.

BOWEN, G. S. et al. Geographic variation among St. Louis encephalitis virus strains in viremic response of avian hosts. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 1411–1419, 1980.

CALDART, E. T. et al. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. September, p. 1–20, 2016.

CALISHER C. H. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n.3, p. 37-43, 1989.

CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 745–754, 2015.

CAUSEY, O. R.; SHOPE; R. E.; THEILER, M. Isolation of St. Louis encephalitis virus from arthropods in Pará, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.13, p.449, 1964.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Saint Louis Encephalitis, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/sle/>>. Acesso em: Agosto de 2018.

CEPAGRI. Clima dos Municípios Paulistas – Araraquara. Disponível em: <https://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_037.html>. Acesso em: Agosto de 2018.

CHAROSKY L. et al Síndrome encefálica a 390 possible etiología por virus San Luis. **Revista de la Asociación Médica Argentina**, n. 82, p. 267-9, 1968.

CHAMBERS, T. J. et al. AND REPLICATION ORGJ \ NIZATION, EXPRESSION, I. **Revista de Microbiologia**, v. 44, p. 649–688, 1990.

CHASTEL, C. Eventual role of asymptomatic cases of dengue for the introduction and spread of dengue viruses in non-endemic regions. **Frontiers in Physiology**, v. 3, Article 70, about 4 p., 2012.

CHAVEZ, R.; COLAN, E.; PHILLIPS, I. Fiebre de Oropuche en Iquitos: Reporte preliminar de 5 casos. **Revista Farmacología Terapia**, v. 2, p. 12–14, 1992.

CHUA, S. L.; FOO, L. K. Tree alignment based on needleman-wunsch algorithm for sensor selection in smart homes. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 8, E1902, about 15 p., 2017.

CIOTA, A. T. et al. Cell-specific adaptation of two flaviviruses following serial passage in mosquito cell culture. **Virology**, v. 357, n. 2, p. 165-74, 2007.

COUTO-LIMA D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Nature Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4848, 2017.

CUHADAR, S. et al. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. **Biochemia Medica**, v. 23, n. 1, p. 70-7, 2013.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "PROF. ALEXANDRE VRANJAC". Dengue, Chikungunya e Zika, 2019. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologicapr of.-alexandre-vranjac/>. 2019. Acesso em: Agosto de 2019.

D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2195–2198, 2016.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DAVIDSON, A. D. New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5. In **Advances in Virus Research**, n. 74, p. 41-101, 2009.

DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

DE SOUZA LOPES, O.; DE ABREU SACCHETTA, L.; COIMBRA, T.L.M. & PEREIRA, L.E. Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 28, p. 583-585, 1979.

DE SOUZA LUNA, L. K. et al. Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 6, p. 1108–1111, 2017.

DIAZ, L. A. et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1752–1754, 2006.

DIAZ, L. A. et al. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, e1489, 2012.

DIAZ, L. A. et al. Activity Patterns of St. Louis Encephalitis and West Nile Viruses in Free Ranging Birds during a Human Encephalitis Outbreak in Argentina. **PLoS One**, v. 11, n. 8, e0161871, 2016.

DIETZGEN, R. G. et al. Virus taxonomy. In KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ E. J., (editors). Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: **Elsevier**, p 654–681, 2012.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 10–15, 2017.

DONOVAN C. R.; BOWMAN M. Some epidemiological features of poliomyelitis and encephalitis, Manitoba, 1941. **Canadian Public Health**, v. 33, p. 246, 1942.

DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, 2015.

DURLACH R. A., ASTARLOA L. Meningoencephalitis caused by the St. Louis encephalitis virus. **Medicina (B Aires)**, v. 45, n. 4, p. 467-8, 1985.

ELLIOTT R. M.; SCHMALJOHN, C. S. Bunyaviridae. **Fields Virology**. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1244-1282, 2013.

EVANS, A. S. et al. A nationwide serum survey of Argentinian military recruits, 1965-1966. I. Description of sample and antibody patterns with arboviruses, polioviruses, respiratory viruses, tetanus and treponematoses. **American Journal of Epidemiology**, v. 93, p. 111-121, 1971.

FASSLER, J.; COOPER, P. BLAST Glossary. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>>. Acesso em: Agosto de 2018.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FERREIRA, I. B. et al. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 36, p. 265-274, 1994.

FERREIRA, A.C.; CHIARAVALLLOTI, NETO F.; MONDINI, A. Dengue in Araraquara, state of São Paulo: epidemiology, climate and Aedes aegypti infestation. **Revista de Saúde Pública**; n. 52, p. 18, 2018.

FIGUEIREDO, L. T.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. Jatobal virus antigenic characterization by ELISA and neutralization test using EIA as indicator, on tissue culture. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 161–164, 1988.

FIGUEIREDO, L. T. The use of Aedes albopictus C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1990.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, n. 2, v. 13, p. 1643-9, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

FORSHEY, B. M. et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, e787, 2010.

FULOP, L. et al. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, ed. 2–3, p.179–188, 1993.

GARRY, C. E.; GARRY, R. F. Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 1, n. 10, p. 1-16, 2004.

GIDDINGS, L. E. et al. St. Louis Encephalitis Outbreak during 1956 in Grand Junction, Colo. **Public Health Reports**, v. 74, p. 372-375, 1959.

GONZÁLEZ CORTÉS, A. et al. St. Louis encephalomyelitis in Hermosillo, Sonora, Mexico. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 9, n. 4, p. 306-16, 1975.

GOULD E. A. et al. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. **Advances in Virus Research**, n. 59, p. 277-314, 2003.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. April, p. 1–13, 2017.

GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO. **Boletim Epidemiológico Dengue, Febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika**, nº 35, Ed. 01, S.E.-50, 2016.

GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO. **Boletim Epidemiológico Dengue, Febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika**, nº 45, Ed. 01, S.E. 52, 2017.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. Boletim epidemiológico para monitoramento da dengue. Disponível em: **<file:///C:/Users/Windows10/Downloads/Boletim-Semana-50%20(2).pdf>**. 2015. Acesso em: Agosto de 2019.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. Boletim epidemiológico para monitoramento da dengue. Disponível em: **<file:///C:/Users/Windows10/Downloads/Boletim-Semana-50-2016%20(2).pdf>**. 2016. Acesso em: Agosto de 2019.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. Boletim epidemiológico para monitoramento da dengue. Disponível em: **<file:///C:/Users/Windows10/Downloads/Boletim-semana-51-2017%20(3).pdf>**. 2017. Acesso em: Agosto de 2019.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. Boletim epidemiológico para monitoramento da dengue. Disponível em: <file:///C:/Users/Windows10/Downloads/Boletim-semana-52-2018%20(2).pdf>. 2018. Acesso em: Agosto de 2019.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, n. 8, p. 7-16, 2010.

HAMMON, W. M. Encephalitis in Yakima Valley: Mixed St. Louis and Western Equine Type. **JAMA**, v. 121, n. 8, p 560-566, 1941.

HAMMON, W. M.; REEVES, W.C. Laboratory transmission of St. Louis Encephalitis virus by three genera of mosquitoes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 78, n. 4, p. 241-53, 1943.

HEINEN, L. B. S. et al. Saint Louis Encephalitis virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 57, n.3, p. 215-220, 2015.

HOLBROOK, M. R. Historical perspectives on flavivirus research. **Viruses**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2017.

HOSSEINI, M. et al. Evaluation of the Freeze-Thawing Method in Reducing Viral Load of Cytomegalovirus in Breast Milk of Mothers of Preterm Infants. **Breastfeeding Medicine**, v. 11, n. 10, p. 557-560, 2016.

HOYOS-LÓPEZ, R. et al. Molecular identification of Saint Louis encephalitis virus genotype IV in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n.6, p. 719-25, 2015.

HOYOS-LÓPEZ, R. et al. Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p.625–634, 2016.

HUANG, Y. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.L. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. **Frontiers in Microbiology**, n.10, Article 22, p. 1-14, 2019.

HUELSENBECK J. P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v. 294. n. 5550, p. 2310-2314, 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades – Araraquara, 2018a. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/araraquara/panorama>>. Acesso em: Agosto de 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades – Ji-Paraná, 2018b. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ro/ji-parana/panorama>>. Acesso em: Agosto de 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades – Sinop, 2018c. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ro/sinop/panorama>>. Acesso em: Agosto de 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasil em síntese – território: dados geográficos, 2019a. Disponível em: <<https://brasiemsintese.ibge.gov.br/territorio/dados-geograficos.html>>. Acesso em: Março de 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Conheça o Brasil – Território, 2019b. Disponível em: <<https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18311-flora-brasileira.html>>. Acesso em: Agosto de 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação, 2019c. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em: Agosto de 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Conheça o Brasil - População, 2019d. Disponível em: <<https://educa.ibge.gov.br/jo-vens/conheca-o-brasil/populacao/18313-populacao-rural-e-urbana.html>>. Acesso em: Agosto de 2019.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. 2018. Acesso em: Agosto de 2018.

IVERSSON, L. B. Situação atual do conhecimento ecoepidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região da mata atlântica do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 36, p. 343–353, 1994.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviroses and certain other viroses of vertebrates. San Antonio, USA. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1147, 1985.

KATOH, K. et al. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. 511-8, 2005.

KOO, Q. Y. et al. Conservation and variability of West Nile virus proteins. **PLoS One**, v. 4, n. 4, e5352, 2009.

KOPP, A. et al. Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus. **mBio**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2013.

KRAJDEN, M. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1683-6, 1999.

KRAMER, L. D., CHANDLER, L. J. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. **Archives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2341-55, 2001.

KUNIN, C. M.; CHIN, T. D. Y. St. Louis Encephalitis in Hidalgo County, Texas. Clinical and Pathologic Features. **Public Health Reports**, v.72, p. 519-525, 1957.

KUNO, G. et al. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 608–637, 2005.

LADNER, J. T. et al. Genomic and phylogenetic characterization of viruses included in the Manzanilla and Oropouche species complexes of the genus Orthobunyavirus, family Bunyaviridae. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 1055–1066, 2014.

LEDUC J., PINHEIRO F. Oropouche fever, in: MONATH T. P., ed. **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, p. 1–14, 1986.

LENNETTE, E. H.; LONGSHORE, W. A. Western Equine and St. Louis Encephalitis in Man, California, 1945-1950. **California Medicine**, v.75, p. 189-195, 1951.

LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Coords). **Fields Virology. 6th ed.** Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 712-746, 2013.

MAIA, F. G. M. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirão Preto, Brazil: Report of one case. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 96–97, 2014.

MASSAD, E. et al. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 11, 2017.

MCCORMACK, G. P.; CLEWLEY, J. P. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. **Reviews in Medical Virology**, v. 12, n. 4, p. 221-38, 2002.

MCLEAN, R. G.; BOWEN, G. S. Vertebrate Hosts. In: MONATH, T. P (ed). St. Louis encephalitis. Washington, DC: **American Public Health Association**, p. 381–450, 1980.

MERCER D. R., et al. Biting rates and developmental substrates for biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 807-12, 2003.

METTLER, N. E.; CASALS J. Isolation of St. Louis encephalitis virus from man in Argentina. **Acta Virologica**, v. 15, n.2, p. 148-54, 1971.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015, v. 47, n. 16. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>. Acesso em: Abril de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2016, ed. 5. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>>. Acesso em: Maio de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017, 2017a, v. 48, n. 28. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf>. Acesso em: Abril de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Chikungunya manejo clínico. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2017b, ed. 1. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico.pdf>. Acesso em: Maio de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arbovirus urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA), 2019a, v. 50. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmiti-das-pelo-Aedes-publicacao.pdf>>. Acesso em: Maio de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Zika Vírus: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção, 2019b. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus#diagnostico>>. Acesso em: Maio de 2019.

MONATH, T. P. Arthropod-borne encephalitides in the Americas. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, n. 4, p. 513–533, 1979.

MONATH T. P. et al. Variation in virulence for mice and Rhesus monkeys among St. Louis encephalitis virus strains of different origin. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 948–962, 1980.

MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis virus. Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n.1, p.176–178, 2007a.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 84–86, 2007b.

MORALES, M. A. et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 2017.

MOURÃO, M. P. G. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: A perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, state of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 20–26, 2014.

MUCKENFUSS, R. S. Clinical Observations and Laboratory Investigations on 1933 Epidemic of Encephalitis in St. Louis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 10, p. 444-453, 1934.

MURPHY, F. A.; HARRISON, A.K.; WHITFIELD, S.G. Bunyaviridae: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. **Intervirology**, v. 1, n. 4, p. 297-316, 1973.

NAÇÕES UNIDAS. **World population prospects: the 2012 revision**. New York: United Nations Department of Economic & Social Affairs, Population Division, p. 94, 2013.

NAVARRO, J. C. et al. Isolation of Madre de Dios virus (Orthobunyavirus; Bunyaviridae), an oropouche virus Species Reassortant, from a Monkey in Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 328–338, 2016.

NEEDLEMAN, S. B.; WUNSCH, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 48, n. 3, p. 443–453, 1970.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E.C. **Molecular evolution: a Phylogenetic Approach**. Oxford: Blackwell Science, p. 352, 1998.

PINHEIRO, F. P. et al. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarem, Para, Brazil. **Tropenmed Parasitol**, v. 27, n. 2, p. 213-23, 1976.

PINHEIRO, F. P. et al. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, n. 12, p. 15–23, 1962.

PINHEIRO F. P. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 145–8, 1981a.

PINHEIRO F. P. et al. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 149-60, 1981b.

PINHEIRO, F. P. et al. Transmission of oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. **Science**, v. 215, n. 4537, p. 1251–1253, 1982.

PINHEIRO, F. P.; ROCHA, A. G.; FREITAS, R. B. Meningitis associated with Oropouche virus infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 24, p. 246–251, 1982.

PINHEIRO F. P.; TRAVASSOS DA ROSA A. P. A. Arboviral zoonoses of Central and South America, in: BERAN G. W. (ed.). **Handbook of Zoonoses**, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 201–225, 1994.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; VASCONCELOS P. F. Oropouche fever, in: FEIGIN R. D. (ed.). **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. 5th. ed. Philadelphia, PA: Saunders, p. 2418–23, 2004.

PREFEITURA MUNICIPAL DE ARARAQUARA. Araraquara, A Morada do Sol, 2018. Disponível em: <<http://www.araraquara.sp.gov.br/araraquara/>>. Acesso em: Agosto de 2018.

PREFEITURA MUNICIPAL DE JI-PARANÁ. Ji-Paraná, Portal da Prefeitura, 2018. Disponível em: <<http://www.ji-parana.ro.gov.br/>>. Acesso em: Agosto de 2018.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SINOP, 2018. A cidade. Disponível em: <<https://www.sinop.mt.gov.br/>>. Acesso em: Agosto de 2018.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. **Systematic Biology**, v. 50, n. 4, p. 580-601, 2001.

POSADA D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

POSADA D. Selecting models of evolution. In: SALEMI, M. (Ed). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 256-282, 2009.

RANZENHOFER, E. R. et al: St. Louis Encephalitis in Calvert City, Kentucky, 1955. **American Journal of Hygiene**, v. 65, n. 2, p.147-161, 1957.

REEVES, W. C. Partners: serendipity in arbovirus research. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, n. 1, p. 1-6, 2001.

REISEN, W. K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. **Advances in Virus Research**, n. 61, p. 139-83, 2003.

REISEN, W. K.; WHEELER, S. S. Surveys for Antibodies against mosquito-borne encephalitis viruses in California birds, 1996-2013. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 4, p. 264-82, 2016.

RICE, C. M.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. In SCHLESINGER, S.; SCHLESINGER, M. J. (eds.). **The Togaviridae and Flaviviridae**. New York: Plenum, p. 279-326, 1986.

RIGGS, S.; SMITH, D. L.; PHILLIPS, C. A. St. Louis encephalitis in adults during the 1964 Houston epidemic. **JAMA**, v. 193, p. 284-8, 1965.

ROBY, J. A. et al. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 96, Pt 7, p.1551-69, 2015.

ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281–285, 2005.

RÖDER, B. et al. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4260-2, 2010.

RODRIGUES, S. G. et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 10, p. 2420–2427, 2010.

ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 292–298, 2017.

ROSA, A. P. et al. Outbreak of oropouche virus fever in Serra Pelada, municipality of Curionópolis, Pará, 1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 29, p. 537–541, 1996.

ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.

SAEED, M. F. et al. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 743–748, 2000.

SAEED, M. F. et al. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. **Virus Research**, v. 77, n. 1, p.25-30, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAKKAS, H. et al. Oropouche fever: A review. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, R. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, N. Y.: Cold spring harbor laboratory press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SESSIONS, O. M et al. Discovery of insect and human dengue virus host factors. **Nature**, v. 458, n. 724, p. 1047-50, 2009.

SINOP EM DADOS. Clima. Disponível em: <<http://sinopemdados.com.br/geografia-do-municipio/localizacao-geografica/285104>>. Acesso em: Agosto de 2018.

SHINNER, J. J. St. Louis Virus Encephalomyelitis. **Archives Pathology**, v. 75, p. 309-322, 1963.

SPENCE, L. et al. St. Louis encephalitis in southern Ontario: laboratory studies for arboviruses. **Canadian Medical Association Journal**, v. 116, n. 1, p. 35–37, 1977.

SPINSANTI, L. I. et al. Age-related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Cordoba, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 59–62, 2002.

SVOBODA, W. K. et al. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 280-6, 2014.

TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: MIURA, R.M. (ed). **Some Mathematical Questions in Biology – DNA Sequence Analysis**. Providence, Rodhe Island: American Mathematical Society, p. 56-87, 1986.

TEIXEIRA NUNES, M. R. et al. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1610–1613, 2005.

TERZIAN, A. C. B. et al. Sporadic Oropouche Infection, Acre, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 348–350, 2009.

TESH, R. B. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 740, p. 129–137, 1994.

THEILER, M.; DOWNS, W. G. **The arthropod-borne viruses of vertebrates**. New Haven, London: Yale University Press, p. 578-622, 1973.

THIES, S. F. et al. Frequency and diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sinop, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 544-552, 2016.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

TILSTON-LUNEL, N. L. et al. Genetic analysis of members of the species Oropouche virus and identification of a novel M segment sequence. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1636–1650, 2015.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man, in: TRAVASSOS DA ROSA A. P. A., VASCONCELOS P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA J. F. S. (Eds.), An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries. **Instituto Evandro Chagas**, p. 19–31, 1998.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1019–1030, 2017.

TRENT, D. W. et al. Variation among strains of St. Louis encephalitis virus: basis for a genetic, pathogenetic and epidemiologic classification. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 354, p. 219, 1980.

TSAI, T. F. Epidemiological aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Harris County, Texas, 1986. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, p.351–356, 1988.

VANDAMME, A. M. Basic Concepts of Molecular Evolution. In: SALEMI, M. (Ed). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, p.1-23, 2009.

VASCONCELOS, H. B. et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 800–806, 2011.

VASCONCELOS, H. B. et al. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-33, 2009.

VEDOVELLO, D. et al. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 5, p. 1189–1195, 2015.

VERNAL, S.; MARTINI C. C. R.; DA FONSECA B. A. L. Oropouche Virus-Associated Aseptic Meningoencephalitis, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 380-382, 2019.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240-56, 2013.

WATTS, D. M. et al. Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 2, p.148-52, 1997.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789–801, 2004.

WEAVER, S. C., REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p.328-45, 2010.

WEBSTER, L. T.; FITE, G. L. A virus encountered in the study of material from cases of encephalitis in the St. Louis and Kansas City epidemics of 1933. **Science**, v. 78, n. 2029, p. 463-65, 1933.

WESTAWAY, E. G. Flavivirus replication strategy. **Advances in Virus Research**, v. 33, n.45, p. 45-90, 1987.

WHELAN, S.; LIO, P.; GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the art methods for looking into the past. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 5, p. 262-272, 2001.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vector-borne diseases, 2019. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em: Agosto de 2018.

WISE, E. L. et al. Isolation of Oropouche Virus from Febrile Patient, Ecuador. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 935–937, 2018.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303–314, 2012.

YU, K. et al. Structural, antigenic, and evolutionary characterizations of the envelope protein of newly emerging duck Tembusu virus. **PLoS One**, v. 8, n. 8, e71319, 2013.

ZHANG, X. et al. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. **Viruses**, v. 9, n.11, 2017.

Capítulo 2

1. Artigo

Concomitant detection of Saint Louis encephalitis virus in two Brazilian States

Abstract

We describe the concomitant circulation of Saint Louis encephalitis virus (SLEV) in two Brazilian states during outbreaks of dengue and Zika viruses. We detected SLEV in patients from São Paulo State, and in patients and mosquitoes from Mato Grosso State. Phylogenetic analysis grouped our samples within genotype V of SLEV.

Saint Louis encephalitis virus (SLEV), a mosquito-borne disease, was first described after an outbreak of encephalitis in Saint Louis, Missouri, USA, in 1933. SLEV is maintained in enzootic cycles involving *Culex* mosquitoes as vectors and birds as amplifying hosts (1). Although considered a public health concern in the USA (2), human cases outside North America are poorly reported. In Brazil, the first case was described in 1970 (3) and there were reports of SLEV circulation in other parts of the country after that. For instance, the state of São Paulo had a human case of SLEV in 2004 (4) and the first outbreak caused by the virus in 2006 (5); three cases were reported in Cuiabá, state of Mato Grosso in 2015 (6).

The majority of infections by SLEV is asymptomatic and initial clinical manifestations are characterized by mild febrile illness, resembling disease caused by dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) or Zika (ZIKV) viruses; severe cases, however, may evolve to affect central nervous system, causing confusion, disorientation, dizziness, tremors, and unsteadiness in patients. Case-fatality ratio ranges from five to 15%, and it increases with age (7).

Diagnosis of infections by arthropod-borne viruses, or arboviruses, is based on clinical-epidemiological criteria; however, infections by SLEV are

usually subclinical. As symptomatic cases may be misdiagnosed as other important arboviruses such as DENV, ZIKV or CHIKV, the lack of diagnostic algorithms for SLEV results in the silent circulation of the virus.

The study

We detected the concomitant circulation of SLEV in two different states of Brazil. The virus was detected in humans and mosquitoes during outbreaks of DENV and ZIKV. We analyzed 364 and 423 febrile patients, respectively from Sinop (11°50'53"S and 55°38'57"W), state of Mato Grosso, and Araraquara (21°47'37"S and 48°10'52"W), state of São Paulo State (Figure 1). Febrile patients who presented to public health units and had clinical diagnosis of infection by DENV, CHIKV (after 2013) or ZIKV (after 2015) were enrolled in our surveillance studies. Our protocols were approved by Internal Review Boards from Federal University of Mato Grosso (128/CEP-HUJM/2011 and 288.172/2013) and from São Paulo State University (CAAE: 27464814.4.0000.5426).

In May 2011, the first patient infected with SLEV was reported to health authorities of Sinop (Table 1); in that occasion, the virus was also circulating in Southern Mato Grosso (6). Furthermore, between December 2015 and April 2016, we detected SLEV in two patients from Sinop and one patient from Araraquara (Table 1) amidst increasing reports of DENV, CHIKV and the emergence of ZIKV in Brazil. SLEV was detected using a strategy previously described (5). The patients had no recent travel history and presented mild symptoms such as fever, headache, retro-orbital pain, and nausea; leukocytes ranged from 8,000-10,000 mm³ and platelets around 200,000mm³. Moderate symptoms in children and young adults are usually expected (7).

Interestingly, we collected a pool of *Culex (Cx) quinquefasciatus* infected with SLEV 16 months before the human cases that occurred in Sinop in 2015. Mosquito collections were performed during a phlebotomine sand fly surveillance (8). Mosquitoes were collected with CDC light traps from 6:00 p.m. to 7:00 a.m., for three consecutive nights per month in 12 different sites of Sinop; mosquito fieldwork occurred from May of 2014 to April of 2015. Adult

specimens were identified morphologically, and pooled according to species, sex, and collection site. Viral RNA was extracted with TRIzol (Life Technologies, USA) and the virus was detected using RT-PCR (5). The positive pool contained one female of *Cx. quinquefasciatus* and was collected in August of 2014. Later in 2015, one pool of *Cx. quinquefasciatus* with SLEV was also detected in Cuiabá - Mato Grosso (6), 500km south of Sinop. Although the role of this species in active transmission of the virus is not clear in the state of Mato Grosso, *Culex* mosquitoes are usually competent vectors for SLEV. For instance, *Cx. nigripalpus*, *Cx. tarsalis* and *Cx. quinquefasciatus* are responsible for SLEV transmission in the USA; on the other hand, *Cx. declarator* and *Cx. coronator* play an important role in the maintenance of the virus in Brazilian forest areas (1).

We sequenced a portion of SLEV NS5 protein from both mosquito and human samples with Big Dye Terminator 3.1 in ABI 3130 DNA Sequencer. Sequence sizes ranged from 187 to 844 bp (Accession numbers: MK341488; MH709010; MH709011; MH709012; MH709013). Phylogenetic analysis was performed using MEGA7 and representative sequences of the NS5 gene from GenBank (Supplementary Table). The tree was edited using FigTree v.1.4.4. Our phylogenetic reconstruction shows seven genotypes of SLEV (I-VII) and topology is similar to analysis performed with complete genomes (9). Although genotype VIII is underrepresented due to lack of NS5 sequences, analyses based on this protein produce topologies that are comparable to a complete genome assessment (10). Our human and mosquito samples clustered within genotype V of SLEV (Figure 2). Although genotypes II and III of SLEV were isolated in the state of São Paulo respectively from a mosquito in the 1960's (11), and from a febrile woman in 2004 (12), the outbreak that occurred in São José do Rio Preto, in 2006 (5), which is 180 km from Araraquara, was also caused by genotype V of SLEV. Genotype V seems to be widely spread in the country (9) and have circulated in cities next to Araraquara and Sinop (6, 13). It may have been introduced in the state of São Paulo in 2004-05, when an increase in neutralizing antibodies for SLEV in birds of São Paulo was reported (Instituto Adolpho Lutz: unpublished data), followed by first human reported outbreak in the country in 2006 (5).

Conclusions

Recent epidemics caused by ZIKV and CHIKV clearly reminded health policy makers that the emergence of arboviruses is a real threat and a recurring fact over decades. The reemergence of yellow fever virus (YFV) and the continuous transmission of dengue (DENV) serotypes is also an indication that arthropod-borne viruses are important public health issues that have been continuously neglected. Although detected more than 50 years ago, SLEV circulation has been widely disregarded by official surveillance systems in Brazil, despite all reports in humans, mosquitoes, and other animals, such as horses (14) and capuchin monkeys (15). Detection of SLEV amidst DENV and ZIKV outbreaks was heavily influenced by the existence of active research strategies for arbovirus detection. Our findings reinforce the need for continuous surveillance of SLEV circulation and for extensive investigation of the etiological agent of febrile diseases. It remains unclear if the detection of SLEV in *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes 16 months before human cases was a sentinel event for the later circulation of the virus. The concomitant detection of the virus in cities from different Brazilian states suggests that genotype V of SLEV is adapted to different selection pressures and may as well be circulating in other parts of the country.

Acknowledgments

This study has been supported by Brazilian Ministry of Health (Grant 797320/2013); CAPES (Institutional grant) and the Program of Support to Scientific Development (PADC/FCF). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 478876/2010-6); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT /SES-MT/CNPq 002/2013 and FAPEMAT/Universal 003/2014). We are thankful to Hamilton Antônio de Oliveira Monteiro from the Division of Arboviroly and Hemorrhagic Fevers of Evandro Chagas Institute for helping with mosquito identification.

References

1. Vasconcelos PF da C, Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa AP de A, Dégallier N, Pinheiro F de P, Sá Filho GC. Epidemiologia das encefalites por

- arbovírus na Amazônia brasileira. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1991, 33: 465-76, (in Portuguese).
2. Curren EJ, Lindsey NP, Fischer M, Hills SL. St. Louis Encephalitis Virus Disease in the United States, 2003-2017. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Oct;99(4):1074-1079.
 3. Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa AP, Leite OF. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30:145-8.
 4. Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP, et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47:281-5.
 5. Mondini A, Cardeal IL, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jan;13(1):176-8.
 6. Heinen LBS, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF, Gondim BHF, MAM dos Santos, et al. Saint Louis Encephalitis virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2015 May-Jun;57(3):215-220.
 7. Simon LV, Graham C. St. Louis Encephalitis. [Updated 2019 Feb 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470426/>.
 8. Thies SF, Bronzoni RVM, Espinosa MM, Souza CO, Ribeiro ALM, dos Santos ES et al. Frequency and diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sinop, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016. 49(5):544-552. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0251-2016>
 9. Rodrigues SG, Nunes MR, Casseb SM, Prazeres AS, Rodrigues DS, Silva MO, et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. *J Gen Virol.* 2010 Oct;91(Pt 10):2420-7.
 10. Vedovello D, Drumond BP, Marques RE, Ullmann LS, Fávaro EA, Terzian AC, et al. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. *Arch Virol.* 2015 May;160(5):1189-95.
 11. Kramer LD, Chandler LJ. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. *Arch. Virol.* 2001 Dec;146(12):2341-55.

12. Santos CL, Sallum MA, Franco HM, Oshiro FM, Rocco, IM. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Feb;101(1):57-63.
13. Maia FG, Chávez JH, de Souza WM, Romeiro MF, de Castro-Jorge LA, da Fonseca BA, et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirão Preto, Brazil: report of one case. *Int J Infect Dis*. 2014 Sep;26:96-7.
14. Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MRQ, et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Nov; 7(11): e2537.
15. de Oliveira-Filho EF, Oliveira RAS, Ferreira DRA, Laroque PO, Pena LJ, Valença-Montenegro MM, et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Aug;65(4):1094-1097.

Table 1. Clinical and laboratory findings of patients infected with SLEV.

Patient	City	Gender	Age (years)	Collection month	Days after symptoms onset	Clinical signs	Leukocytes count (/mm ³)	Platelets count (/mm ³)	Laboratory confirmation
279	Sinop	Female	8	05/2011	4	Fever, headache, abdominal pain, myalgia, vomiting, diarrhea, arthralgia and bitter taste in mouth	10,810	252,000	N-PCR; SS
815	Sinop	Male	1	12/2015	2	Fever	13,560	295,000	N-PCR; SS
835	Sinop	Female	5	12/2015	2	Fever and headache	8,310	212,000	N-PCR; SS
278	Araraquara	Female	15	04/2016	NA	Headache, retro-orbital pain, nausea, prostration	NA	NA	N-PCR; SS

*NA: Not available; N-PCR: Nested polymerase chain reaction; SS: Sanger sequencing.

Legends

Figure 1. Cartographic representation of the study sites: Araraquara, State of São Paulo (red) and Sinop, State of Mato Grosso (blue).

Figure 2. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model. The tree with the highest log likelihood (-1210.97) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (6 categories (+G, parameter = 0.9122)). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 41 nucleotide sequences. There were a total of 188 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7. Red cycles represent our sequences.

Figure 1.

Figure 2.

