

Relatório de Vigilância Genômica de arbovírus - Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (Lacen-MT)

Período: 13 a 17 de maio de 2024

Requerente: Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso – Lacen-MT

Coordenador: Luiz Carlos Junior Alcantara (IRR/FIOCRUZ)

Equipe: Elaine Cristina de Oliveira, Júlia Deffune Almeida, Luiz Marcelo Ribeiro Tomé, Marta Giovanetti, Natália Guimarães, Vagner Fonseca e Stephanni Figueiredo da Silva.

1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

No período de 13 a 17 de maio de 2024, a equipe coordenada pelo Dr. Luiz Alcantara (IRR/FIOCRUZ) realizou o sequenciamento de 102 amostras positivas para arbovírus, oriundas do Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (Lacen-MT), com diagnóstico molecular detectável para *Orthoflavivirus denguei* (Dengue virus 1 – DENV-1) (n=23), *Orthoflavivirus denguei* (Dengue virus 2 – DENV-2) (n=30), *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) (n=40) e *Orthobunyavirus oropoucheense* (Oropouche virus - OROV) (n=09).

As amostras foram submetidas à síntese de cDNA e reações de PCR multiplex utilizando conjuntos de primers patógeno-específicos para amplificação dos genomas virais completos, conforme disponível no *Centre for Arbovirus: Discovery, Diagnostics, Genomics and Epidemiology* (CADDE) (<https://www.caddecentre.org/protocols/>). Os genomas foram sequenciados nas plataformas MiSeq (Illumina) e MinION (Oxford Nanopore) utilizando os kits de preparo de biblioteca Illumina COVIDSeq Assay (MiSeq Reagent Kit v2 Micro, 300 cycles) e *Ligation Sequencing* - SQK-LSK109 (Native barcoding EXP-NBD114, *flow cell* R9.4.1), respectivamente.

Os dados brutos do sequenciamento foram processados através da ferramenta online *Genome Detective* (<https://www.genomedetective.com/>) que realiza a montagem dos genomas e identificação dos genótipos/linhagens virais (Vilsker *et al.*, 2019). A classificação das linhagens foi confirmada por análises filogenéticas.

2. RESULTADOS PRELIMINARES

2.1 Sequenciamento de Dengue virus sorotipo 1 (DENV-1)

As amostras de DENV-1 (n=23) sequenciadas foram provenientes de 14 municípios do estado do Mato Grosso (MT) (**Figura 1**), coletadas entre março e abril de 2024, e apresentaram valores de CT entre 13 e 26 (média Ct=17,76). Os novos genomas gerados (n=21) apresentaram cobertura média de 94,54% (89,40% - 97,30%) e foram classificados como Dengue vírus sorotipo 1 genótipo V. As informações epidemiológicas e as estatísticas do sequenciamento estão dispostas na **Tabela 1**.

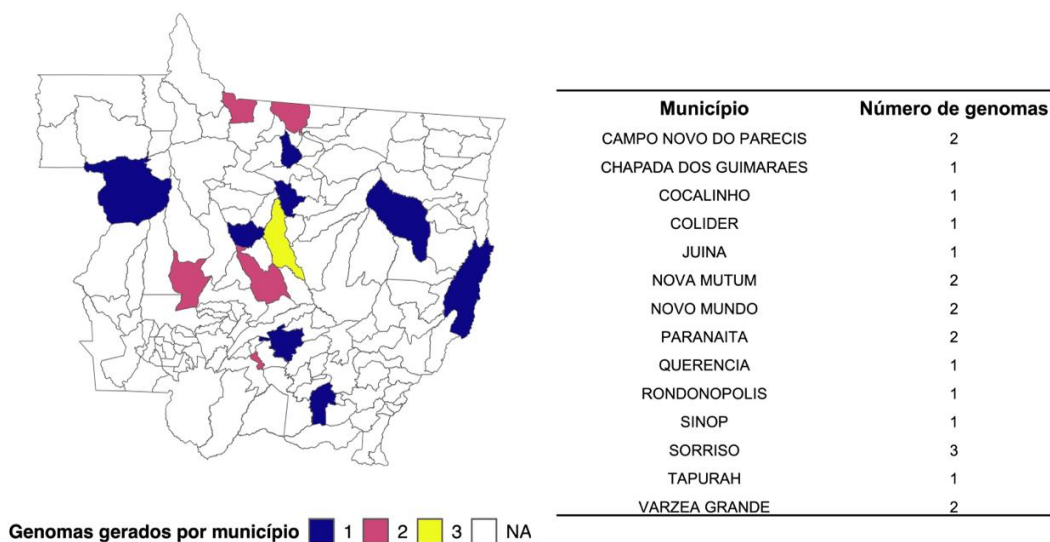


Figura 1. Mapa do estado do Mato Grosso destacando os municípios de coleta e o número de novos genomas de DENV-1 gerados.

Com a finalidade de estudar em mais detalhes a epidemiologia molecular das sequências de DENV-1 obtidas em distintos municípios do estado do Mato Grosso (MT) foi reconstituída uma árvore filogenética inferindo as relações evolutivas entre os novos genomas e um dataset de genomas de referência pertencentes ao DENV-1. Análises preliminares mostraram que as sequências de DENV-1 do MT encontraram-se dispersas por 2 distintos clados (clado III e IV), sendo indicativo de múltiplos eventos de introdução, mediados por isolados da região Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Espírito Santo) do país (**Figura 2**).

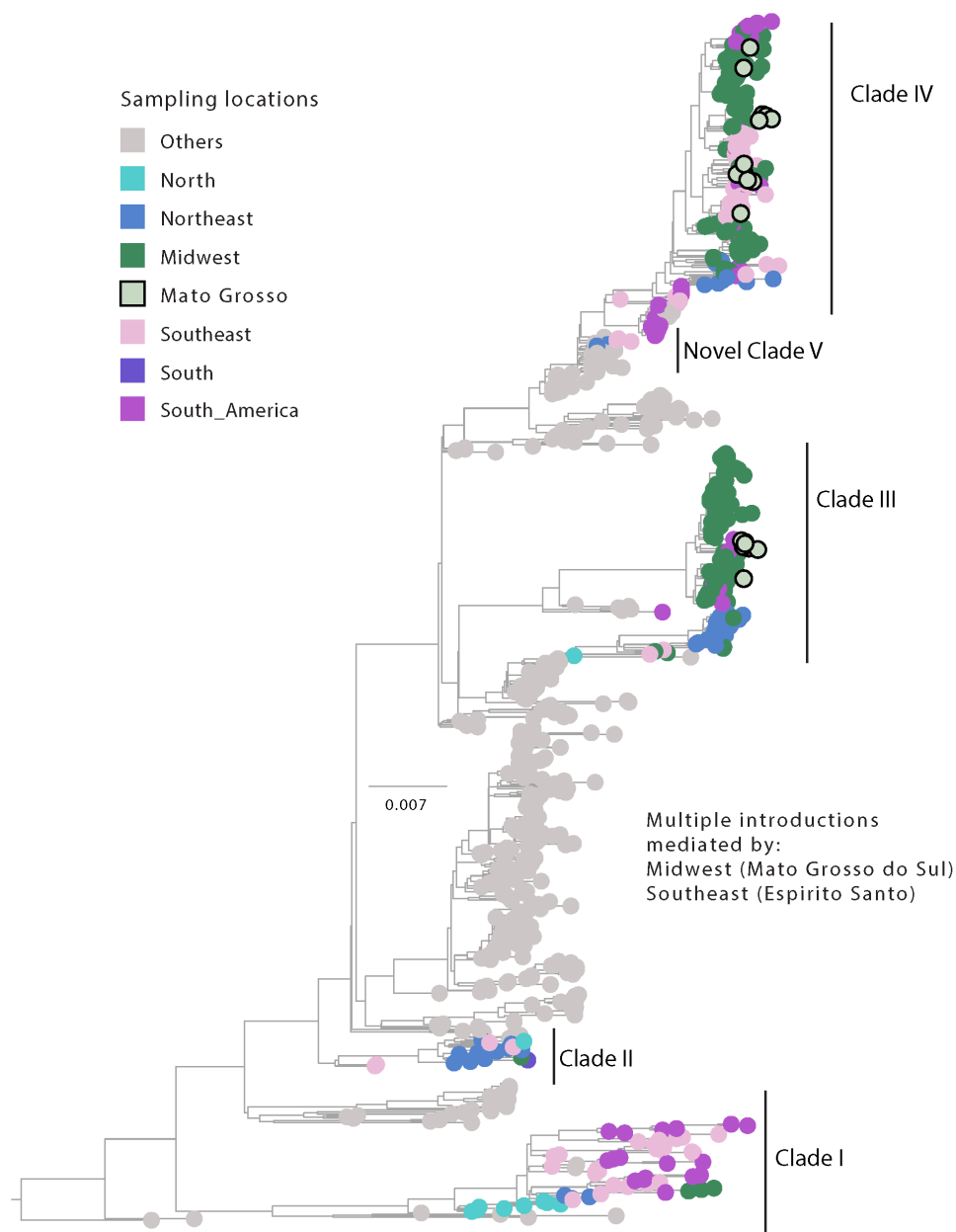


Figura 2. Árvore de Máxima Verossimilhança contendo os genomas de DENV-1 obtidos durante o treinamento em vigilância genômica no Estado do Mato Grosso - MT. Os círculos representam os isolados sequenciados de acordo o local de coleta (conforme legenda de cores). Os novos isolados (círculos destacados em negrito) encontraram-se dispersos por 2 distintos clados (clado III e IV), sendo indicativo de múltiplos eventos de introdução. As sequências obtidas mostraram-se intimamente relacionadas a outros isolados da região Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Espírito Santo) do país.

Tabela 1 - Dados epidemiológicos e estatística de sequenciamento para amostras de Dengue vírus sorotipo 1 obtidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (Lacen-MT)

GAL	CT	Estado	Município	Data de coleta	Data de sintomas	Vírus	Cober- tura	Linhagem
241507000034	22	MT	COLIDER	19/03/2024	16/03/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,7648	Genotype V
241307000073	19	MT	QUERENCIA	22/03/2024	19/03/2024	<i>Dengue virus type I</i>	93,2464	Genotype V
241006000064	16	MT	PARANAITA	25/03/2024	23/03/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,7834	Genotype V
240712000025	21	MT	TAPURAH	24/03/2024	24/03/2024	<i>Dengue virus type I</i>	93,4886	Genotype V
240106001035	19	MT	VARZEA GRANDE	02/04/2024	02/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	95,0815	Genotype V
240804000265	20	MT	CAMPO NOVO DO PARECIS	02/04/2024	31/03/2024	<i>Dengue virus type I</i>	96,5161	Genotype V
240804000281	21	MT	CAMPO NOVO DO PARECIS	03/04/2024	01/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,9325	Genotype V
241304000049	16	MT	COCALINHO	09/04/2024	05/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	95,2212	Genotype V
240702000171	22	MT	SINOP	09/04/2024	08/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	93,4606	Genotype V
241206000049	13	MT	NOVO MUNDO	04/04/2024	03/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,7089	Genotype V
241206000050	15	MT	NOVO MUNDO	05/04/2024	03/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,6716	Genotype V

240708000661	15	MT	SORRISO	11/04/2024	11/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,6437	Genotype V
240708000943	14	MT	SORRISO	15/04/2024	14/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,6064	Genotype V
240106001246	17	MT	VARZEA GRANDE	17/04/2024	15/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,1127	Genotype V
240113000098	23	MT	CHAPADA DOS GUIMARAES	18/04/2024	16/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	93,4886	Genotype V
241006000094	13	MT	PARANAITA	10/04/2024	09/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	96,749	Genotype V
240708001053	19	MT	SORRISO	18/04/2024	17/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,5971	Genotype V
240221000058	26	MT	RONDONOPOLIS	16/04/2024	13/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	89,4085	Genotype V
240705000309	14	MT	NOVA MUTUM	17/04/2024	14/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	97,3079	Genotype V
240705000329	14	MT	NOVA MUTUM	19/04/2024	17/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	94,6064	Genotype V
240508000119	14	MT	JUINA	04/04/2024	04/04/2024	<i>Dengue virus type I</i>	95,0629	Genotype V

2.2 Sequenciamento de Dengue vírus sorotipo 2 (DENV-2)

As amostras de DENV-2 (n=30) sequenciadas foram provenientes de 19 municípios do estado do MT (**Figura 3**), coletadas entre janeiro e abril de 2024, e apresentaram valores de Ct entre 16 e 27 (média Ct = 20,17). Os novos genomas de DENV-2 (n=28) gerados apresentaram cobertura média de 94,16% (92,93 – 95,84%) e foram classificados como Dengue vírus sorotipo 2 genótipo II (Cosmopolita). As informações epidemiológicas e as estatísticas do sequenciamento estão detalhadas na **Tabela 2**.

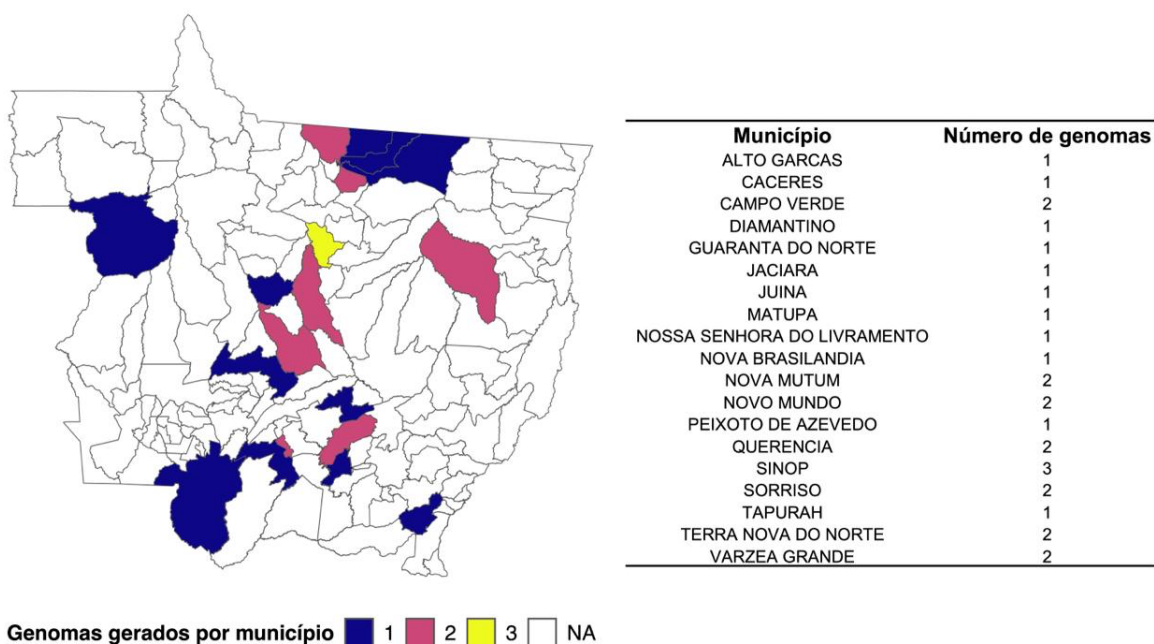


Figura 3. Mapa do estado do Mato Grosso destacando os municípios de coleta e o número de novos genomas de DENV-2 gerados.

Com a finalidade de estudar em mais detalhes a epidemiologia molecular das sequências de DENV-2 obtidas na região de Mato Grosso, foi reconstituída uma árvore filogenética inferindo as relações evolutivas entre os genomas obtidos e o dataset de genomas de referência pertencentes ao DENV-2. Nessa análise, a árvore filogenética (**Figura 4**) confirmou que as sequências isoladas no estado do MT pertencem ao genótipo II (Cosmopolita).

Interessantemente, as novas sequências geradas durante o treinamento se agrupam com genomas de diversos estados brasileiros, incluindo Nordeste (Bahia), Sudeste (Espírito Santo), Sul (Paraná) e Norte (Tabatinga), indicando possivelmente múltiplos eventos de introdução desse vírus no estado. Devido a amostragem, não é possível inferir sobre a direção da dispersão, dados sobre o histórico de viagem dos pacientes poderão ajudar a elucidar melhor esse evento.

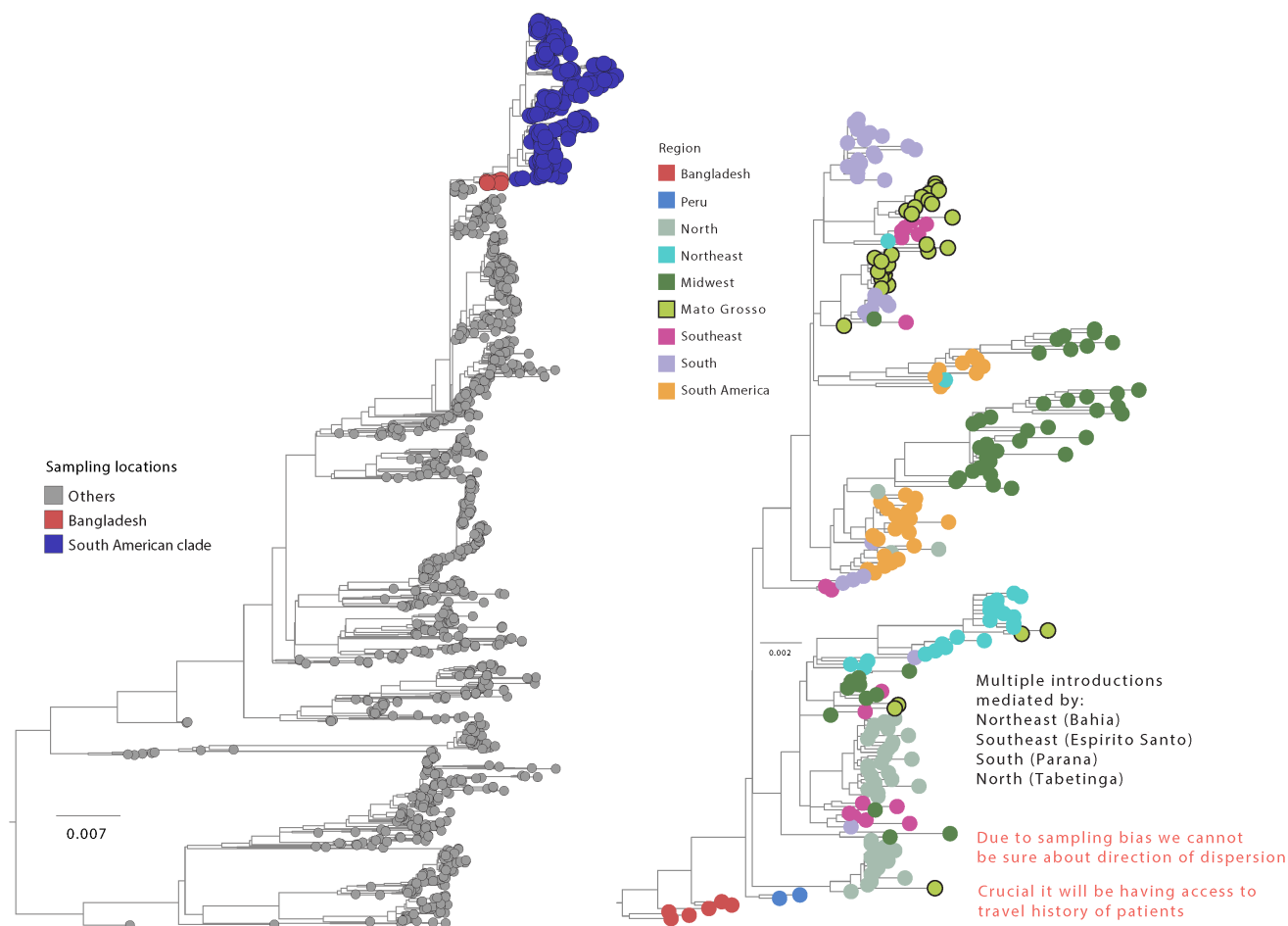


Figura 4. Árvore de Máxima Verossimilhança contendo os genomas de DENV-2 obtidos durante a atividade de vigilância genômica no MT. Os círculos representam os isolados sequenciados de acordo o local de coleta (conforme legenda de cores). As novas sequências (círculos destacados em negrito), pertencentes ao genótipo Cosmopolita, encontram-se relacionadas com genomas de diversos estados brasileiros, Nordeste (Bahia), Sudeste (Espírito Santo), Sul (Paraná) e Norte (Tabatinga), indicando possivelmente múltiplos eventos de introdução desse vírus no estado.

Tabela 2 - Dados epidemiológicos e estatística de sequenciamento para amostras de Dengue vírus sorotipo 2 obtidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (Lacen-MT)

GAL	CT	Estado	Município	Data de coleta	Data de sintomas	Assignment	Coverage	Lineages
240116000001	19	MT	NOSSA SENHORA DO LIVRAMENTO	05/01/2024	02/01/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,69	Genotype II
240115000014	24	MT	NOVA BRASILANDIA	22/01/2024	19/01/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	95,84	Genotype II
241205000010	18	MT	TERRA NOVA DO NORTE	01/02/2024	30/01/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,99	Genotype II
240712000018	18	MT	TAPURAH	23/02/2024	22/02/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,41	Genotype II
241205000022	21	MT	TERRA NOVA DO NORTE	22/02/2024	18/02/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,81	Genotype II
240702000085	24	MT	sinop	04/03/2024	01/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,69	Genotype II
241307000052	23	MT	QUERENCIA	11/03/2024	09/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,56	Genotype II
240210000005	26	MT	JACIARA	21/03/2024	17/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,03	Genotype II
240206000166	17	MT	CAMPO VERDE	20/03/2024	20/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,57	Genotype II
240206000167	19	MT	CAMPO VERDE	21/03/2024	20/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,67	Genotype II
241206000038	20	MT	NOVO MUNDO	18/03/2024	17/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,61	Genotype II
241206000041	19	MT	NOVO MUNDO	21/03/2024	19/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,61	Genotype II
240508000077	16	MT	JUINA	20/03/2024	20/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	95,45	Genotype II
240106000095	18	MT	VARZEA GRANDE	28/03/2024	27/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,98	Genotype II
240708000406	26	MT	SORRISO	11/03/2024	11/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,12	Genotype II
241203000021	18	MT	MATUPA	11/03/2024	08/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,68	Genotype II
240702000157	20	MT	sinop	02/04/2024	31/03/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,45	Genotype II
240705000226	27	MT	NOVA MUTUM	02/04/2024	01/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,33	Genotype II
241204000005	20	MT	PEIXOTO DE AZEVEDO	05/04/2024	03/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,13	Genotype II
240705000260	17	MT	CACERES	04/04/2024	01/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,09	Genotype II

240106001220	16	MT	VARZEA GRANDE	17/04/2024	15/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,78	Genotype II
241307000242	24	MT	QUERENCIA	15/04/2024	14/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,80	Genotype II
241202000183	24	MT	GUARANTA DO NORTE	10/04/2024	07/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,58	Genotype II
240708001057	22	MT	SORRISO	18/04/2024	16/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	92,93	Genotype II
240203000078	16	MT	ALTO GARÇAS	17/04/2024	14/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	94,81	Genotype II
240702000262	17	MT	SINOP	18/04/2024	17/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,77	Genotype II
240705000310	20	MT	NOVA MUTUM	17/04/2024	17/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,45	Genotype II
240705000313	16	MT	DIAMANTINO	19/04/2024	19/04/2024	<i>Dengue virus type 2</i>	93,55	Genotype II

2.3 Sequenciamento de *Alphavirus chikungunya* (CHIKV)

As amostras de CHIKV (n=40) sequenciadas foram provenientes de 17 municípios do estado do MT (**Figura 5**), coletadas entre fevereiro e abril de 2024, e apresentaram valores de Ct entre 13 e 26 (média Ct = 20,3). O sequenciamento possibilitou a geração de 36 novos genomas de CHIKV, que apresentaram cobertura média de 95% (91,5% – 98,3%) e foram classificados como genótipo *East-Central-South-African* (ECSA). As amostras com requisição do GAL 240106001097, 240705000234, 240203000066 e 240708000603 não geraram dados suficientes para identificação e foram excluídas das análises. As informações epidemiológicas e as estatísticas do sequenciamento estão detalhadas na **Tabela 3**.

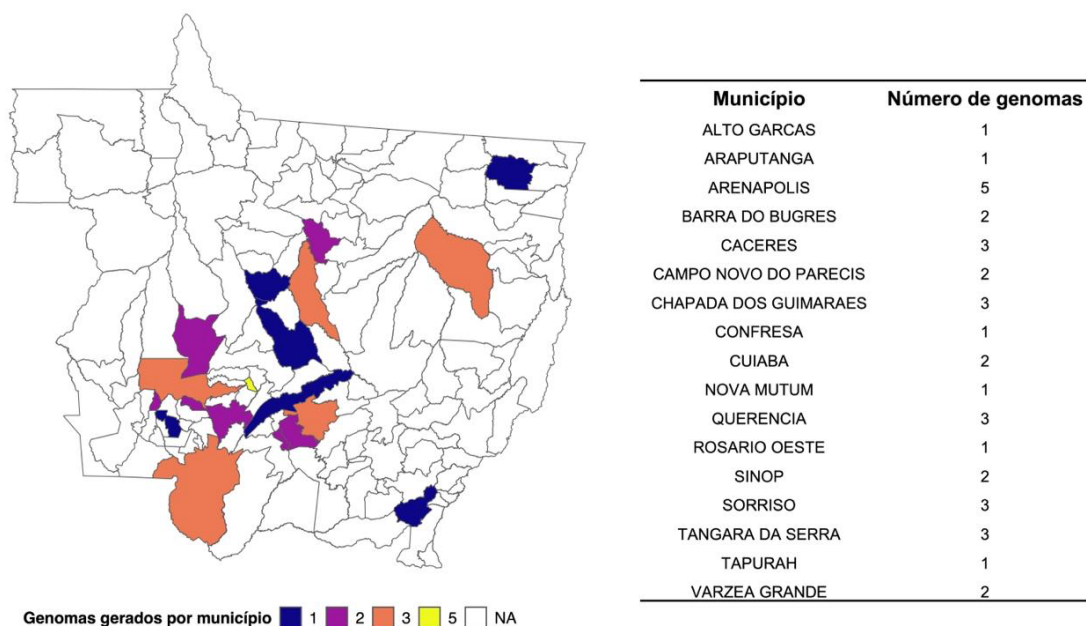


Figura 5. Mapa do estado do Mato Grosso destacando os municípios de coleta e o número de novos genomas de CHIKV gerados.

Com a finalidade de estudar em mais detalhes a epidemiologia molecular das sequências de CHIKV obtidas e notificadas em distintos municípios do estado do MT foi reconstituída uma árvore filogenética inferindo as relações evolutivas entre os genomas obtidos e o dataset de genomas de referência pertencentes a vírus do mesmo genótipo. Nessa análise, a árvore filogenética mostrou que os novos isolados do Mato Grosso obtidos durante o treinamento formam um clado monofilético e encontram-se filogeneticamente próximos a outros isolados do estado de Minas Gerais (**Figura 6**).

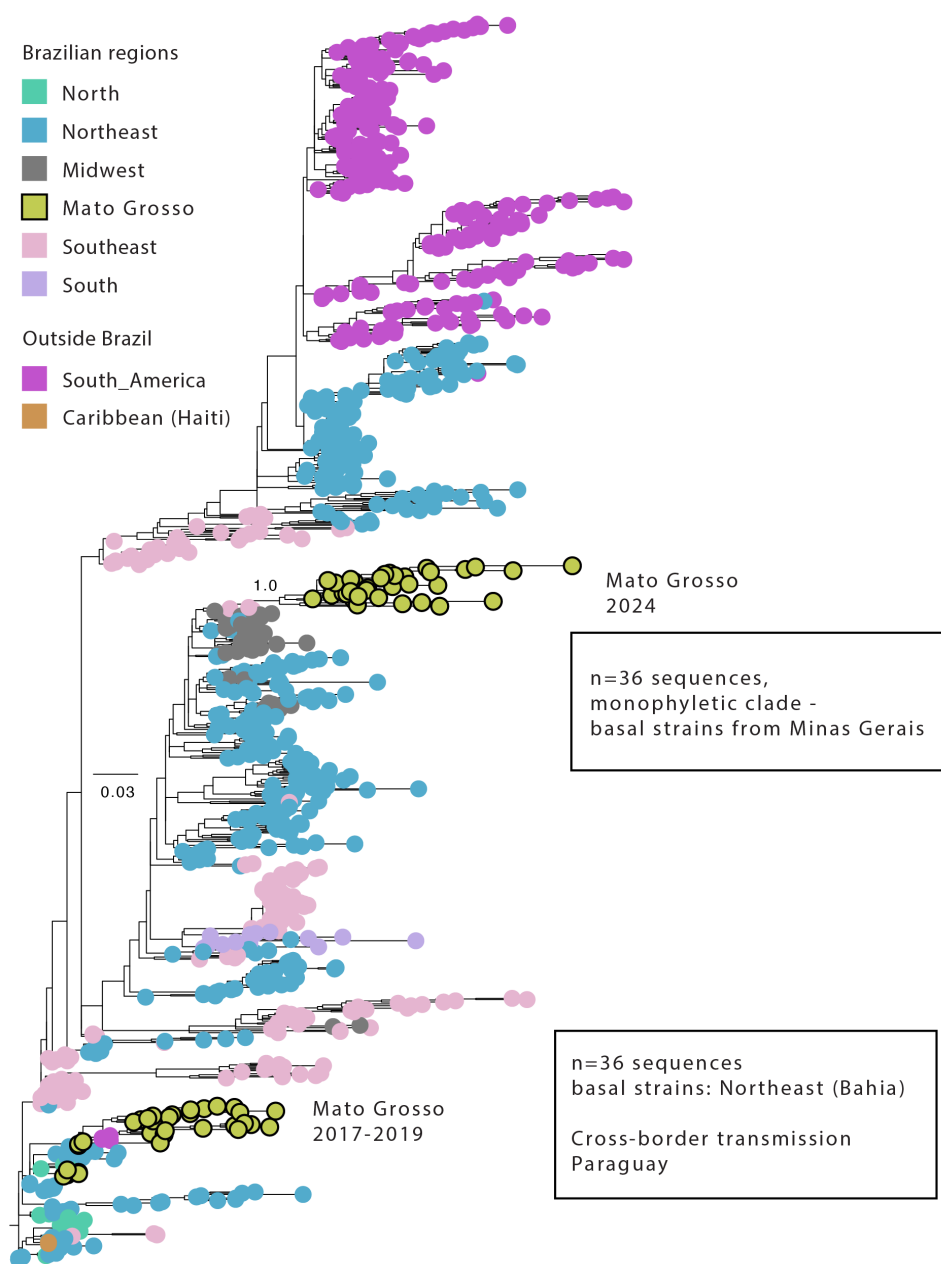


Figura 6. Árvore de Máxima Verossimilhança contendo os genomas de CHIKV obtidos durante as atividades de vigilância genômica no MT. Os círculos representam os isolados sequenciados de acordo o local de coleta (conforme legenda de cores). As sequências do MT (círculos destacados em negrito) obtidas entre 2017 e 2019 e em 2024 no Mato Grosso pertencentes ao genótipo *East-Central-South-African* (ECSA) e se agrupam em dois clados distintos. Os genomas de 2024 formam um clado monofilético, e encontram-se relacionadas a outras sequências do Sudeste (Minas Gerais).

Tabela 3 - Dados epidemiológicos e estatística de sequenciamento para amostras de CHIKV (ECSA) obtidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (LACEN-MT)

GAL	CT	Estado	Município	Data de coleta	Data de sintomas	Assignment	Coverage	Lineages
240603000033	26	MT	CONFRESA	01/02/2024	01/02/2024	<i>Chikungunya virus</i>	91,5	ECSA
240702000100	26	MT	TAPURAH	08/03/2024	06/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
240811000968	24	MT	BARRA DO BUGRES	18/03/2024	16/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
240804000227	17	MT	CAMPO NOVO DO PARECIS	25/03/2024	22/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,5	ECSA
240803000022	18	MT	BARRA DO BUGRES	14/03/2024	13/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,3	ECSA
240702000138	20	MT	SINOP	27/03/2024	26/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,6	ECSA
240103000345	21	MT	CUIABÁ	27/03/2024	25/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,6	ECSA
240811001082	21	MT	TANGARÁ DA SERRA	28/03/2024	27/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,6	ECSA
240113000047	22	MT	CHAPADA DOS GUIMARÃES	02/04/2024	31/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
241307000166	23	MT	QUERÊNCIA	27/03/2024	26/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
241307000128	24	MA	QUERÊNCIA	27/03/2024	25/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	93	ECSA
241307000159	19	MT	QUERÊNCIA	27/03/2024	26/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,6	ECSA
240804000826	24	MT	CAMPO NOVO DO PARECIS	04/04/2024	01/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
240811001099	21	MT	TANGARA DA SERRA	02/04/2024	31/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,4	ECSA
240113000052	18	MT	CHAPADA DOS GUIMARAES	08/04/2024	04/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,3	ECSA
240705000232	24	MT	NOVA MUTUM	03/04/2024	01/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
240802000071	20	MT	ARENAPOLIS	02/04/2024	31/03/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA

240802000087	22	MT	ARENAPOLIS	04/04/2024	02/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,1	ECSA
240802000097	13	MT	ARENAPOLIS	05/04/2024	03/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	98,2	ECSA
240113000083	19	MT	CHAPADA DOS GUIMARAES	12/04/2024	10/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	96,3	ECSA
240402000240	22	MT	CACERES	12/04/2024	09/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,3	ECSA
240402000241	24	MT	CACERES	12/04/2024	09/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,1	ECSA
240413000109	26	MT	ARAPUTANGA	10/04/2024	10/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	93,6	ECSA
240906000009	17	MT	ROSARIO OESTE	16/04/2024	14/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,3	ECSA
240811001144	19	MT	TANGARA DA SERRA	10/04/2024	07/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	96,4	ECSA
240203000073	16	MT	ALTO GARCAS	16/04/2024	14/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	97,1	ECSA
240708000652	21	MS	SORRISO	11/04/2024	10/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,8	ECSA
240103000421	16	MT	CUIABÁ	16/04/2024	13/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,6	ECSA
240802000149	21	MT	ARENAPOLIS	12/04/2024	10/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,3	ECSA
240802000155	15	MT	ARENAPOLIS	16/04/2024	12/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,2	ECSA
240708000962	20	MT	SORRISO	16/04/2024	15/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
240106001243	20	MT	VARZEA GRANDE	18/04/2024	16/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,5	ECSA
240106001293	15	MT	VARZEA GRANDE	23/04/2024	21/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,5	ECSA
240702000263	17	MT	SINOP	19/04/2024	17/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	95,2	ECSA
240708001146	17	MT	SORRISO	22/04/2024	20/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,5	ECSA
240402000291	23	MT	CACERES	23/04/2024	19/04/2024	<i>Chikungunya virus</i>	94,7	ECSA

2.4 Sequenciamento de *Orthobunyavirus oropoucheense* (Oropouche virus – OROV)

As amostras de Oropouche virus (n=9) sequenciadas foram provenientes de 2 municípios do estado do MT (**Figura 7**), coletadas em abril de 2024, e apresentaram valores de Ct entre 15 e 26 (média Ct = 21,6). O sequenciamento possibilitou a geração de 9 novos genomas de OROV, as informações epidemiológicas e as estatísticas do sequenciamento dos 3 segmentos: L, M e S, encontram-se detalhadas nas tabelas abaixo (**Tabelas 4 a 7**).

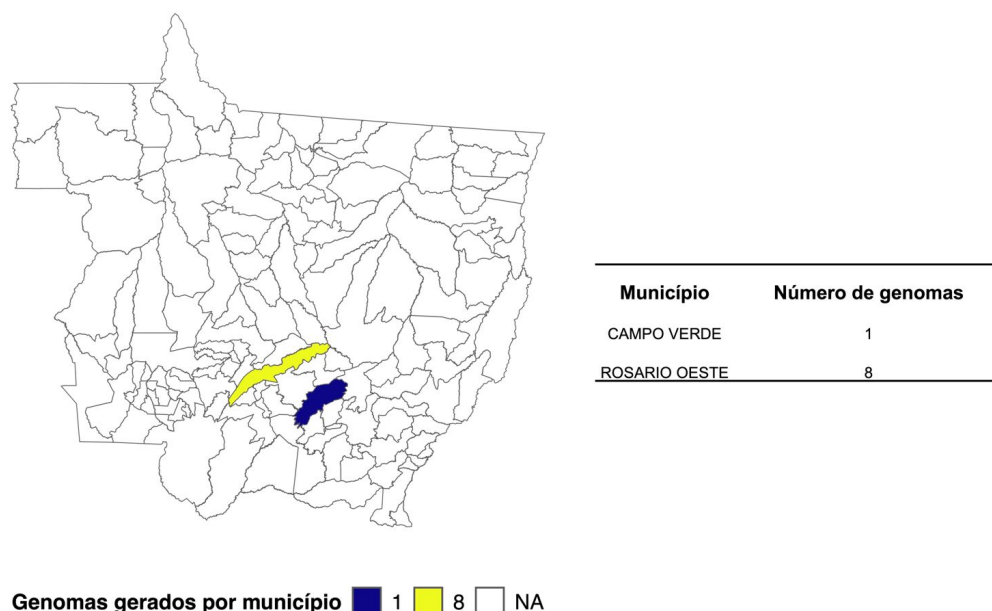


Figura 7. Mapa do estado do Mato Grosso destacando os municípios de coleta e o número de novos genomas de OROV gerados.

Com a finalidade de estudar em mais detalhes a epidemiologia molecular das sequências de OROV obtidas e notificadas no estado do MT, foi reconstituída uma árvore filogenética do seguimento S inferindo as relações evolutivas entre os genomas obtidos e o dataset de genomas de referência. Nessa análise, a árvore filogenética infere que os novos isolados do Mato Grosso se agrupam em dois clado e encontram-se filogeneticamente relacionados a outros isolados dos estados do Norte (Acre, Amazonas e Rondônia) e Nordeste (Bahia) (**Figura 8**).

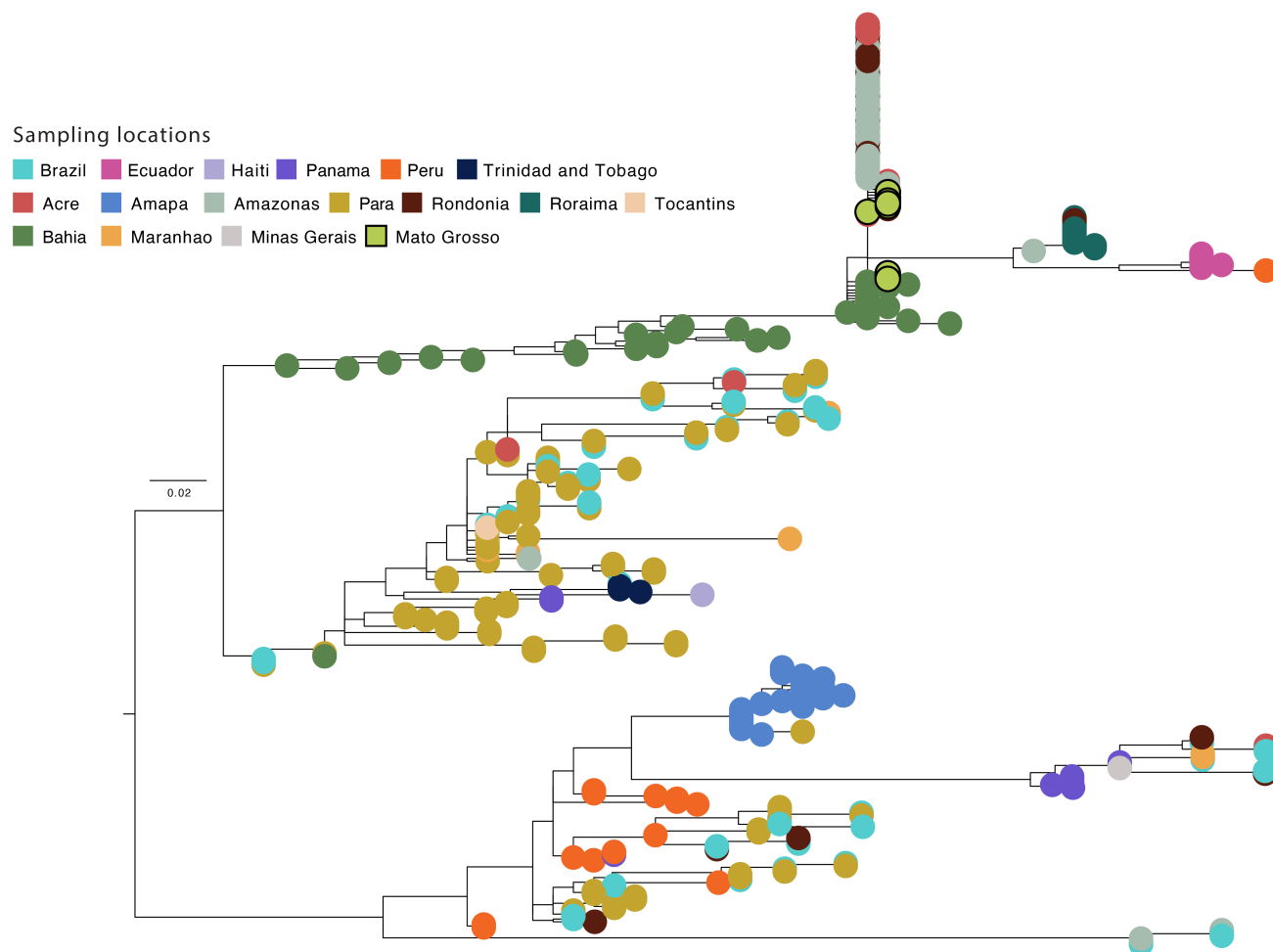


Figura 8. Árvore de Máxima Verossimilhança do segmento S dos genomas de OROV obtidos durante as atividades de vigilância genômica no MT. Os círculos representam os isolados sequenciados de acordo o local de coleta (conforme legenda de cores). As sequências do MT (círculos destacados em negrito) obtidas em 2024 pertencem a espécie *Orthobunyavirus oropoucheense*, encontram-se agrupados em dois clados e estão filogeneticamente relacionados a outros isolados dos estados do Norte (Acre, Amazonas e Rondônia) e Nordeste (Bahia).

Tabela 4 - Dados epidemiológicos das amostras de OROV obtidas no Lacen-MT

GAL	CT	Gê-nero	Município	Data de sintomas	Data de coleta	Sinais e Sintomas e/ou desfecho clínico
240906000010	26	F	ROSARIO OESTE	13/04/2024	16/04/2024	mialgia, artralgia, calafrios e febre
240906000012	23	F	ROSARIO OESTE	15/04/2024	17/04/2024	mialgia, artralgia e febre
240906000017	22	F	ROSARIO OESTE	21/04/2024	23/04/2024	Não informado
240906000022	22	M	ROSARIO OESTE	22/04/2024	24/04/2024	cefaleia, mialgia e artralgia
240906000023	22	F	ROSARIO OESTE	22/04/2024	24/04/2024	Cefaleia e mialgia
240906000027	20	F	ROSARIO OESTE	23/04/2024	25/04/2024	Não informado
240906000028	20	M	ROSARIO OESTE	21/04/2024	25/04/2024	febre, mialgia e cefaleia
240906000031	25	F	ROSARIO OESTE	25/04/2024	24/04/2024	Não informado
240206000233	15	M	CAMPO VERDE	20/04/2024	25/04/2024	óbito

F, feminino; M, masculino.

Tabela 5 - Estatística de sequenciamento do segmento L das amostras de OROV obtidas no Lacen-MT

GAL	Classificação	Reads	Profundidade de cobertura	Identidade de NT	Identidade de AA	Coertura
240906000010	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	76065	5803,3	89,8	97,3	99,0
240906000012	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	151810	11422,3	89,8	97,3	98,3
240906000017	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	151461	11610,9	89,7	97,2	98,4
240906000022	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	149299	11554,6	89,7	97,4	98,2
240906000023	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	203976	16607,0	89,8	97,3	98,9
240906000027	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	199091	16377,5	89,7	97,2	98,6
240906000028	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	212478	16880,8	89,7	97,3	98,2
240906000031	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	50813	4323,5	89,8	97,4	99,1
240206000233	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	93228	7927,6	89,6	97,4	98,2

Tabela 6 - Estatística de sequenciamento do segmento S das amostras de OROV obtidas no Lacen-MT

GAL	Classificação	Reads	Profundidade de cobertura	Identidade de NT	Identidade de AA	Coertura
240906000010	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	40656	27579,1	95,8	99,7	97,1
240906000012	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	13611	18256,4	95,7	99,7	96,4
240906000017	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	14538	8800,6	95,7	99,7	96,3
240906000022	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	15130	9042,7	95,7	99,7	95,8
240906000023	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	26839	16907,7	95,8	99,7	97,3
240906000027	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	33485	19487,6	95,9	99,7	99,7
240906000028	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	42155	24262,8	95,6	99,7	96,3
240906000031	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	21974	18331,8	95,5	99,7	98,1
240206000233	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	18382	10151,6	95,8	99,7	97,3

Tabela 7 - Estatística de sequenciamento do segmento M das amostras de OROV obtidas no Lacen-MT

GAL	Classificação	Reads	Profundidade de cobertura	Identidade de NT	Identidade de AA	Coertura
240906000010	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	190330	18821,5	96,2	98,1	99,7
240906000012	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	230988	21424,6	96,1	98,0	99,7
240906000017	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	272199	24702,0	96,1	98,1	99,6
240906000022	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	237521	21793,1	96,1	98,2	99,7
240906000023	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	301057	27381,2	96,1	98,0	99,7
240906000027	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	328592	31416,6	96,2	98,1	99,9
240906000028	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	338865	31300,7	96,1	98,0	99,9
240906000031	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	129865	11937,8	96,2	98,1	99,7
240206000233	<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>	196233	18315,9	96,1	98,0	99,8

Referências Bibliográficas

Adelino, T.É.R., Giovanetti, M., Fonseca, V. et al. Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil. *Nat Commun* 12, 2296 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22607-0>.

Cleemput S, *et al.* Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. *Bioinformatics* **36**, 3552-3555 (2020).

Fonseca, V. *et al.* A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007231 (2019).

Giovanetti, M. *et al.* Genomic and Epidemiological Surveillance of Zika Virus in the Amazon Region. *Cell Rep.* 2020 Feb 18;30(7):2275-2283.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.085.

Quick, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* **12**, 1261–1276 (2017).

Vilsker M, *et al.* Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* **35**, 871-873 (2019).

Belo Horizonte, MG, 19 de julho de 2024



Luiz Carlos Júnior Alcantara

Pesquisador Titular em Saúde Pública

Instituto René Rachou – Fiocruz Minas Gerais

Grupo de Mosquitos vetores: endossimbiontes e interação patógeno-vetor

Relatório de Vigilância Metagenômica de Patógenos Emergentes e Reemergentes – Lacen Mato Grosso (MT)

Referência: Análise de metagenômica de amostras positivas e negativas para arboviroses do Lacen-MT;

Período: 13 a 17 de maio de 2024

Coordenador: Luiz Carlos Junior Alcantara (Instituto René Rachou – Fiocruz Minas)

Responsáveis: Luiz Marcelo Ribeiro Tomé (Instituto René Rachou – Fiocruz Minas), Natália Rocha Guimarães (Instituto René Rachou – Fiocruz Minas) e Vagner Fonseca (Universidade do Estado da Bahia - Uneb).

Equipe Lacen: Elaine Cristina de Oliveira (Lacen-MT), Júlia Deffune Almeida (Lacen-MT) e Stephanni Figueiredo da Silva (Lacen-MT).

1 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

No período de 13 a 17 de maio de 2024, foram realizadas, no Lacen-MT/Cuiabá, atividades de vigilância genômica e metagenômica de amostras positivas e negativas para arboviroses urbanas (Dengue, Zika e Chikungunya). O objetivo foi sequenciar os genomas virais, investigar as linhagens e genótipos dos vírus circulantes no Mato Grosso, bem como identificar possíveis patógenos emergentes e reemergentes.

Foram sequenciadas 15 amostras de pacientes com diagnóstico positivo para *Orthobunyavirus oropoucheense* (Vírus Oropouche - OROV) e 8 amostras de pacientes com resultado negativo para *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) *Orthoflavivirus denguei* (DENV), e *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) por meio do diagnóstico molecular (RT-qPCR) utilizando o kit “IBMP Biomol ZDC” (Tabela 1).

As amostras selecionadas foram coletadas entre 19 de março e 03 de maio de 2024, de pacientes que apresentavam sintomas clássicos de arboviroses, tais como febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia, exantema, fadiga, náusea e vômito, dor retro-orbital e conjuntivite. As amostras de OROV apresentaram valores de CT (Cycle Threshold) variando de 15 a 36.

Tabela 1- Dados epidemiológicos das amostras submetidas a metagenômica viral no LACEN-MT.

Requisição GAL	Idade (anos)	Barcode sequenciamento	Gênero	Município solicitante	Data de sintomas	Data de coleta	Resultado RT-qPCR	Sinais e Sintomas e/ou desfecho clínico
241202000151	40	01	F	GUARANTA DO NORTE	15/03/2024	20/03/2024	POS+ OROV	febre, mialgia, cefaleia, exantema, vômito, náuseas, dor nas costas, conjuntivite, artrite, artralgia intensa e dor retro orbital
240906000010	55	02	F	ROSARIO OESTE	13/04/2024	16/04/2024	POS+ OROV	mialgia, artralgia, calafrios e febre
240906000012	22	03	F	ROSARIO OESTE	15/04/2024	17/04/2024	POS+ OROV	mialgia, artralgia e febre
240906000017	16	04	F	ROSARIO OESTE	21/04/2024	23/04/2024	POS+ OROV	Não informado
240906000018	50	05	F	ROSARIO OESTE	20/04/2024	24/04/2024	POS+ OROV	febre, mialgia, cefaleia, coriza e congestão nasal
240906000020	53	06	M	ROSARIO OESTE	21/04/2024	24/04/2024	POS+ OROV	cefaleia e febre
240906000021	33	07	M	ROSARIO OESTE	22/04/2024	24/04/2024	POS+ OROV	febre, mialgia, artralgia e cefaleia
240906000022	16	08	M	ROSARIO OESTE	22/04/2024	24/04/2024	POS+ OROV	cefaleia, mialgia e artralgia
240906000023	45	09	F	ROSARIO OESTE	22/04/2024	24/04/2024	POS+ OROV	cefaleia e mialgia
240906000027	38	10	F	ROSARIO OESTE	23/04/2024	25/04/2024	POS+ OROV	Não informado
240906000028	44	11	M	ROSARIO OESTE	21/04/2024	25/04/2024	POS+ OROV	febre, mialgia e cefaleia
240906000031	16	12	F	ROSARIO OESTE	25/04/2024	24/04/2024	POS+ OROV	Não informado
241202000220	37	14	M	GUARANTA DO NORTE	22/04/2024	22/04/2024	POS+ OROV	Não informado
241202000241	32	15	F	GUARANTA DO NORTE	22/04/2024	26/04/2024	POS+ OROV	Não informado
240206000233	76	16	M	CAMPO VERDE	20/04/2024	25/04/2024	POS+ OROV	óbito
240906000052	51	17	F	ROSARIO OESTE	25/04/2024	02/05/2024	NEG	Não informado
240106001515	11	18	M	VARZEA GRANDE	01/05/2024	03/05/2024	NEG	Não informado
240704000069	15	19	F	LUCAS DO RIOI VERDE	07/04/2024	10/04/2024	NEG	mialgia generalizada, febre e dor retro orbital
241202000151	40	20	F	GUARANTA DO NORTE	15/03/2024	19/03/2024	NEG	febre, vômitos, dor retro orbital, artralgia intensa, diarreia e fraqueza

241202000146	34	21	F	GUARANTA DO NORTE	17/03/2024	21/03/2024	NEG	febre, mialgia, cefaleia, dor nas costas, conjuntivite, dor retro orbital
240221000029	10	22	M	RONDONOPOLIS	31/03/2024	05/04/2024	NEG	Conjuntivite, artralgia, lesões exantemáticas e febre
240106001401	6	23	F	VARZEA GRANDE	27/04/2024	28/04/2024	NEG	febre, náuseas e vômito
240906000019	30	24	M	ROSARIO OESTE	21/04/2024	24/04/2024	NEG	mialgia, artralgia, febre, cefaleia, vômitos e exantema

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação de vírus de RNA, amostras de soro dos pacientes foram submetidas a um pré-tratamento para o enriquecimento do material genético viral, seguindo o protocolo descrito por FOMSGAARD *et al.* (2022), com modificações. Este procedimento inclui a aplicação de DNase I à amostra, seguida de filtração através de uma membrana de 0.22 μm .

Após o pré-tratamento, os ácidos nucleicos (DNA e RNA) foram extraídos utilizando o kit *Quick-DNA/RNA Viral MagBead* no equipamento Extracta 96 (Loccus). O RNA resultante foi purificado e concentrado utilizando o Kit *RNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research). Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA com a *SuperScript IV Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific) e iniciadores randômicos, conforme o protocolo SMART-9N descrito por CLARO *et al.* (2023). O cDNA foi amplificado utilizando a enzima *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs) e iniciadores (primers) de acordo com o protocolo SMART-9N.

O cDNA amplificado foi purificado com o reagente *AMPure XP beads*. Em seguida, a biblioteca de sequenciamento foi preparada utilizando os kits *Ligation Sequencing kit* (SQK-LSK109) e *Native Barcoding kit* (EXP-NBD196) da Oxford Nanopore. A biblioteca foi sequenciada no dispositivo MinION (Oxford Nanopore) durante 24 horas, utilizando a *flow cell* R9.4.1 (FLO-MIN106) e o software MinKNOW (v24.02.16) configurado com a função de basecalling desativada. Após o sequenciamento, o basecalling e demultiplexação das bibliotecas foram realizados utilizando o software Guppy (v6.5.7), adotando as funções `guppy_basecaller` e `guppy_barcode`, respectivamente. Em todas as etapas do processamento foi incluído um controle negativo.

Os dados brutos de sequenciamento (*raw data*) foram analisados quanto à qualidade utilizando o software NanoPlot (v1.43.0, github.com/wdecoster/NanoPlot). As *reads* foram trimadas para remoção de bases de baixa qualidade utilizando o software Chopper (v0.8.0). Em seguida, as sequências foram classificadas taxonomicamente utilizando o software Kraken2 (v2.1.3, github.com/DerrickWood/kraken2) e o banco de dados padrão PlusPF (Standard plus RefSeq protozoa e fungi) pré-construído (benlangmead.github.io/aws-indexes/k2), que contém sequências RefSeq (NCBI) de arqueas, bactérias, vírus, plasmídeos, humano, protozoários e fungos. As bibliotecas também foram avaliadas utilizando um banco de dados customizado com sequências virais de referência (RefSeq) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através da funcionalidade de classificação do Kraken2. A visualização dos dados foi

realizada utilizando os softwares R e Pavian (v1.0, disponível em github.com/fbreitwieser/pavian).

As bibliotecas que tiveram *reads* virais detectadas por meio da análise de metagenômica foram submetidas a um pipeline personalizado de montagem de genomas por referência, utilizando os seguintes softwares: FastQC (v0.12.1), Chopper (v0.8.0), Minimap2 (v2.28-r1209), Samtools (v1.20) e Ivar (v1.4.2). A montagem do genoma do vírus da Dengue (*Orthoflavivirus denguei*) foi realizada utilizando a referência NC_001477.1 (Dengue virus 1). Para a montagem do genoma do vírus Oropouche (OROV, *Orthobunyavirus oropoucheense*), foram utilizadas as seguintes sequências genômicas de referência: NC_005776.1 (Oropouche virus segment L), NC_005775.1 (Oropouche virus segment M) e NC_005777.1 (Oropouche virus segment S). Após a montagem, foram considerados para as análises subsequentes apenas os genomas que apresentaram no mínimo 50X de profundidade e cobertura superior a 60% em relação ao genoma de referência. As árvores filogenéticas foram geradas com o software IQ-TREE2 (v2.2.0), utilizando os arquivos contendo as sequências geradas neste trabalho e as sequências de referência obtidas do NCBI.

3 – RESULTADOS

Por meio do sequenciamento metagenômico de *shotgun* das amostras positivas para o vírus Oropouche (OROV) e da aplicação de um pipeline customizado para a montagem do genoma viral, foi possível obter sequências genômicas parciais ou completas dos segmentos do genoma do *Orthobunyavirus oropoucheense* para as amostras com números de Requisição GAL: 240906000017, 240906000022, 240906000027, 240906000028, 240906000031 e 240206000233 (Tabela 2). Para a amostra 240206000233, cujo desfecho clínico foi o óbito, foi possível recuperar sequências genômicas dos segmentos L, M e S, com cobertura superior a 99% e profundidades de 6,253X, 9,280X e 2,186X, respectivamente. As amostras que tiveram o genoma de OROV recuperado pertencem a pacientes dos municípios de Campo Verde (n=1) e Rosário Oeste (n=5) (Figura 1).

A análise das estatísticas gerais do sequenciamento e montagem dos genomas de OROV revelou uma menor eficácia na obtenção de sequências do segmento S (Tabela 2). Além disso, o sequenciamento foi eficaz para amostras com valores de CT entre 15 e 25, indicando que amostras com valores de CT altos não são recomendadas para o sequenciamento de metagenômica visando a obtenção de genomas virais. De forma geral, a cobertura em relação ao genoma de referência do segmento L variou de 92 a 99% (média =

96.84%), do segmento M de 70 a 99.2% (média = 87.8%) e do segmento S de 98.8 a 99.4% (média = 99.1%). A profundidade de sequenciamento para os segmentos variou de 70 a 9,280X.

É importante destacar que em todas as etapas de análise, tanto nos experimentos de bancada quanto nas análises de bioinformática, foi incluído um controle negativo (CN). Os dados do CN indicaram que apenas 31 *reads* foram classificadas como pertencentes ao vírus Oropouche, um número significativamente inferior ao observado nas amostras que tiveram os genomas gerados. A análise de montagem revelou que não foram geradas sequências dos segmentos L, M e S para o CN, reforçando que os resultados obtidos não são decorrentes de contaminação ambiental ou durante o preparo da biblioteca.

Com o objetivo de investigar a epidemiologia molecular e a disseminação do vírus Oropouche (OROV) no Mato Grosso, foram realizadas análises de inferência filogenética de cada segmento dos genomas de OROV gerados para este estudo, juntamente com sequências de referência depositadas no NCBI (Figura 2). A análise dos resultados permitiu concluir que os genomas gerados nesta investigação (segmentos L, M e S), isolados no Mato Grosso, agruparam-se em um clado com sequências genômicas de OROV obtidas entre 2022 e 2023 nos estados do Acre, Amazonas e Rondônia. Este clado possui como ramo basal uma sequência proveniente da Guiana Francesa, gerada em 2020 (Figura 2).

A análise realizada com o software kraken2 utilizando o banco de dados padrão PlusPF identificou um alto número de sequências (66,353 *reads*) classificadas como *Clostridium perfringens* no barcode 12 (Requisição GAL: 240906000031). No controle negativo, nenhuma *read* foi classificada como pertencente a esta espécie de bactéria. Para confirmar a presença de *C. perfringens*, as sequências obtidas foram submetidas ao BLASTx utilizando a ferramenta Diamond (v2.1.9) com o banco de dados Swiss-Prot do UniProt. No entanto, não foi possível confirmar a presença desta bactéria na amostra. Portanto, outras análises de bioinformática são necessárias para a confirmação.

Por meio da análise realizada com o kraken2 utilizando um banco de dados viral customizado, foi possível identificar 3,107 *reads* classificadas como *Pegivirus hominis* (GB virus C) na amostra Requisição GAL: 241202000241 (Barcode 15). Para esta amostra, foi utilizado um pipeline personalizado para montagem por referência do genoma de *Pegivirus hominis*, utilizando a referência do NCBI NC_001710.1 (GB virus C/Hepatitis G virus). Com essa análise, foi possível obter um genoma de GB virus C com 97% de cobertura em relação ao genoma de referência e 408X de profundidade (2,854

reads mapeadas). É importante destacar que no controle negativo não foi detectada nenhuma *read* referente a *Pegivirus hominis*.

A análise das amostras negativas (Tabela 1) permitiu identificar 304,965 *reads* classificadas como Dengue vírus sorotipo 1 (*Orthoflavivirus denguei*) na amostra Requisição GAL 240906000019 (Amostra 20/Barcode 24), oriunda do município de Rosário Oeste (Figura 3a e 3b). No controle negativo, foram identificadas 151 *reads* classificadas como Dengue vírus sorotipo 1 (DENV-1), um número significativamente inferior ao encontrado na amostra, indicando que este resultado não é decorrente de contaminação ambiental ou durante o preparo da biblioteca (Figura 3c). Utilizando o pipeline personalizado, foi possível montar o genoma de DENV-1 a partir desta amostra, obtendo uma sequência genômica com 99.68% de cobertura em relação ao genoma de referência e uma profundidade de 22,570X.

A inferência filogenética realizada para a classificação do genótipo mostrou que a Amostra 20 agrupou-se com sequências de referência pertencentes ao genótipo V de DENV1 (Figura 3d). Portanto, podemos concluir que esta amostra pertence a este genótipo. Além disso, uma árvore filogenética foi gerada com 1,532 sequências genômicas de DENV-1 genótipo V, isoladas nas cinco regiões do Brasil (Figura 4). A partir desta árvore filogenética, observou-se que a Amostra 20 agrupou-se em um clado com sete genomas provenientes da região Sudeste e um da região Sul. Dessa forma, podemos inferir que esse vírus, desta amostra em específico, foi provavelmente introduzido no Mato Grosso (Centro-Oeste) a partir da região Sudeste.

A partir do sequenciamento e das análises de metagenômica realizadas durante a vigilância de patógenos emergentes e reemergentes no Mato Grosso, foram obtidas sequências genômicas parciais e/ou completas do *Orthobunyavirus oropoucheense* (Vírus Oropouche – OROV). Essas sequências permitiram investigar a epidemiologia molecular e a disseminação do vírus no estado. Os resultados sugerem uma possível introdução do OROV no Mato Grosso a partir dos estados do Norte do Brasil, como Acre, Amazonas e Rondônia.

Estudos adicionais sobre a diversidade genética desse vírus são necessários para compreender melhor o processo evolutivo do OROV e correlacionar esses achados com os dados epidemiológicos. Durante a vigilância, também foi possível obter sequências genômicas completas dos segmentos L, M e S de OROV a partir de um caso de óbito ocorrido no município de Campo Verde, Mato Grosso. Esse caso precisa ser investigado

mais a fundo para correlacionar o desfecho clínico com possíveis alterações genômicas do vírus e mudanças no fitness viral.

Outro achado importante da atividade de vigilância foi a identificação e obtenção de um genoma completo de DENV-1 genótipo V de uma amostra previamente negativa para os exames laboratoriais. Esses resultados demonstram a importância da aplicação do sequenciamento de metagenômica na vigilância de patógenos, evidenciando sua eficácia na detecção e caracterização de patógenos emergentes e reemergentes.

Tabela 2 – Métricas dos genomas obtidos por meio do sequenciamento de metagenômica e montagem por referência utilizando o pipeline personalizado

ID Gal	Ct OROV	ID Amostras	Read totais (pós trimagem)	Segmento L			Segmento M			Segmento S		
				Reads mapeadas	Profundidade Média	Cobertura (%)	Reads mapeadas	Profundidade Média	Cobertura (%)	Reads mapeadas	Profundidade Média	Cobertura (%)
240906000017	22	barcode04	10155	420	85,2905	92,1122	553	89,2078	79,7491	-	-	-
240906000022	22	barcode08	28892	843	168,52	98,0573	286	70,1332	70,4219	-	-	-
240906000027	20	barcode10	557785	35834	5713,64	99,2112	31717	6064,72	98,4721	1678	892,391	98,8064
240906000028	20	barcode11	10193	2574	403,203	94,9898	1481	295,938	97,4002	-	-	-
240906000031	25	barcode12	-	-	-	-	1260	246,473	81,4367	-	-	-
240206000233*	15	barcode16*	869514	49191	6253	99,8685	57980	9280,38	99,2702	3496	2186,04	99,4695

* Paciente cujo desfecho clínico foi o óbito

Mapa OROV

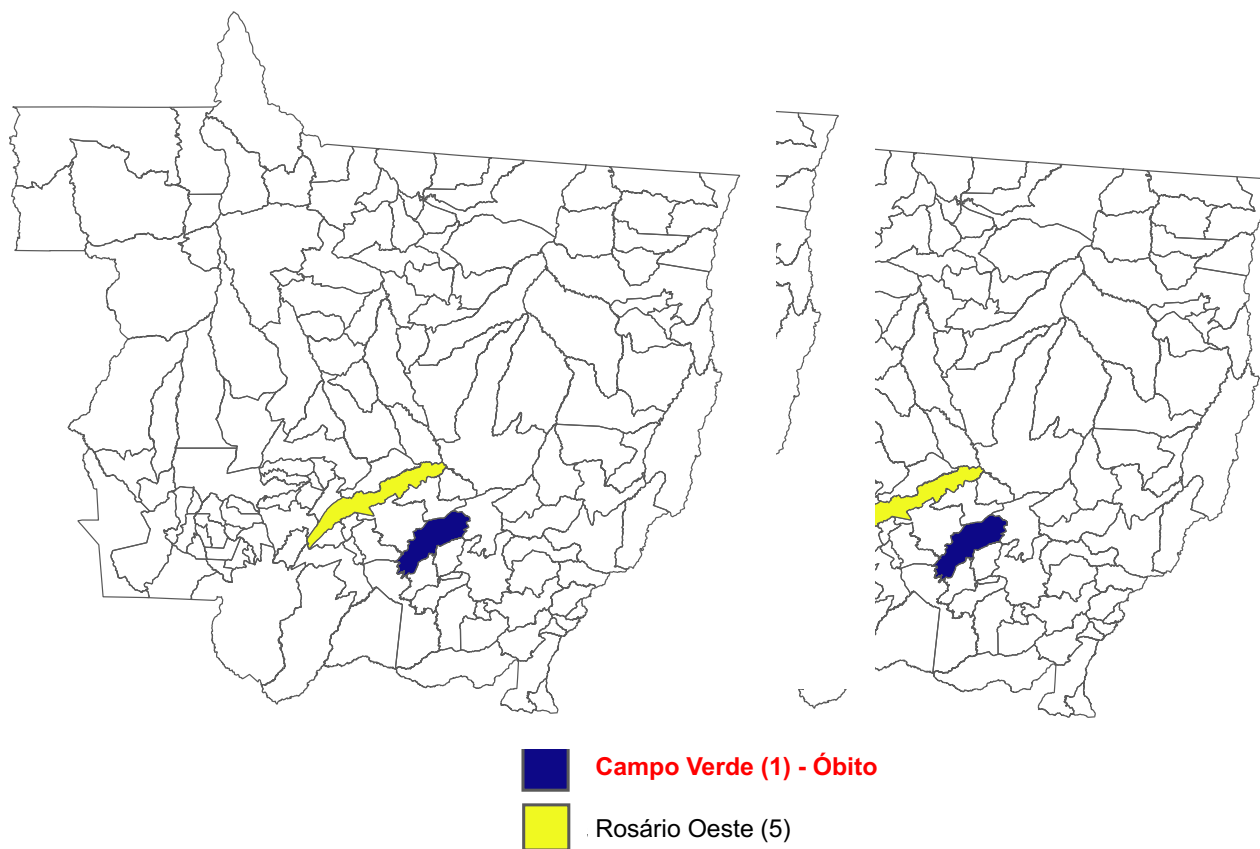


Figura 1 – Municípios com sequências genômicas de *Orthobunyavirus oropoucheense* (OROV) geradas através de sequenciamento de metagenômica de *shotgun* com protocolo de enriquecimento viral.

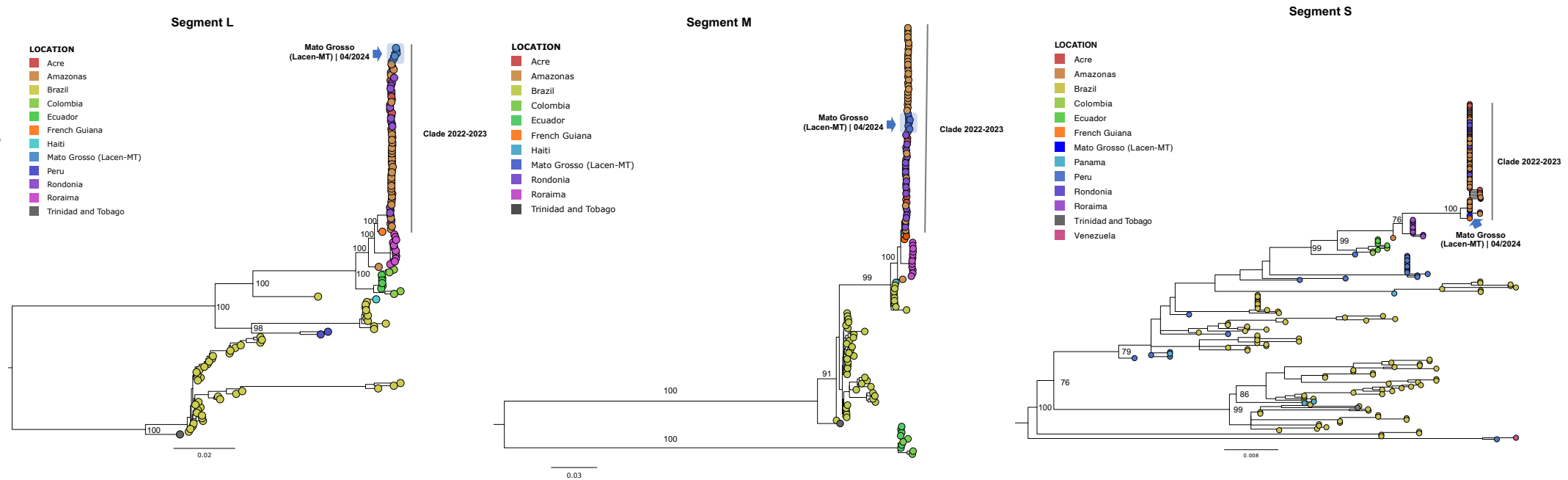


Figura 2 – Árvores de máxima verossimilhança (ML) geradas para os segmentos L, M e S do genoma de *Orthobunyavirus oropoucheense*. As árvores foram geradas com o software IQ-TREE2 (v2.2.0), utilizando os arquivos contendo as sequências geradas neste trabalho e as sequências de referência obtidas do NCBI. A árvore do segmento L foi gerada com 144 sequências, utilizando o modelo evolutivo GTR+F+I+R2. A árvore do segmento M foi gerada com 140 sequências, utilizando o modelo evolutivo GTR+F+I+R2. A árvore do segmento S foi gerada com 224 sequências, utilizando o modelo evolutivo TPM3+I+G4.

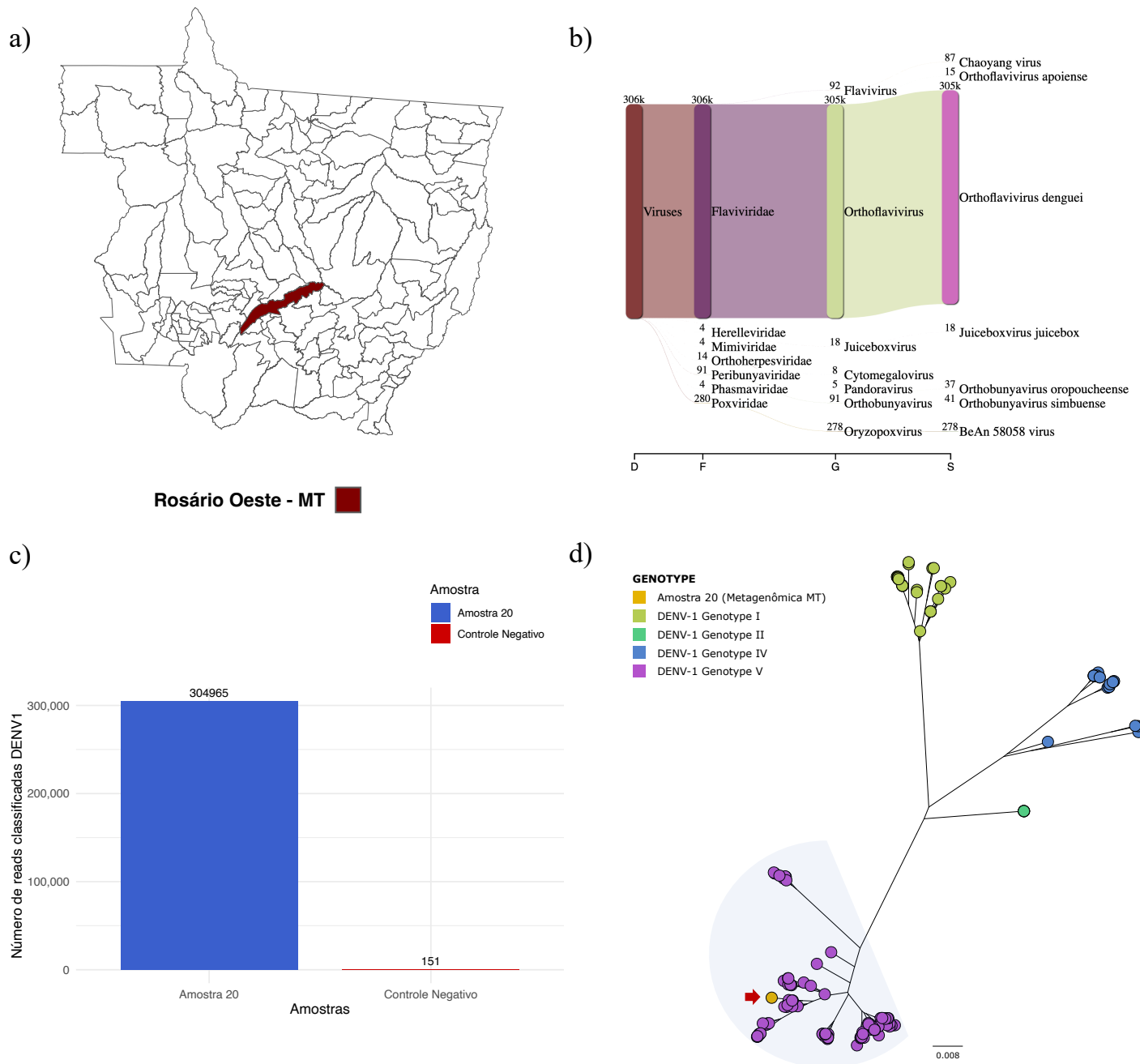


Figura 3 – Análises da amostra 20 (GAL 240906000019, barcode 24), que teve o vírus *Orthoflavivirus denguei* detectado por meio do sequenciamento de metagenômica de *shotgun*. a) Mapa do Mato Grosso destacando o município de Rosário Oeste, local de coleta da amostra em que foi identificado o vírus da dengue. b) Visualização do resultado da análise com kraken2 utilizando o software Pavian, mostrando a classificação taxonômica dos vírus identificados na amostra 20. c) Comparação das *reads* classificadas como DENV-1 na amostra 20 (em azul) e no controle negativo (em vermelho). d) Árvore filogenética mostrando a classificação de DENV-1, genótipo V, com destaque para a amostra 20 (indicada com uma seta vermelha).

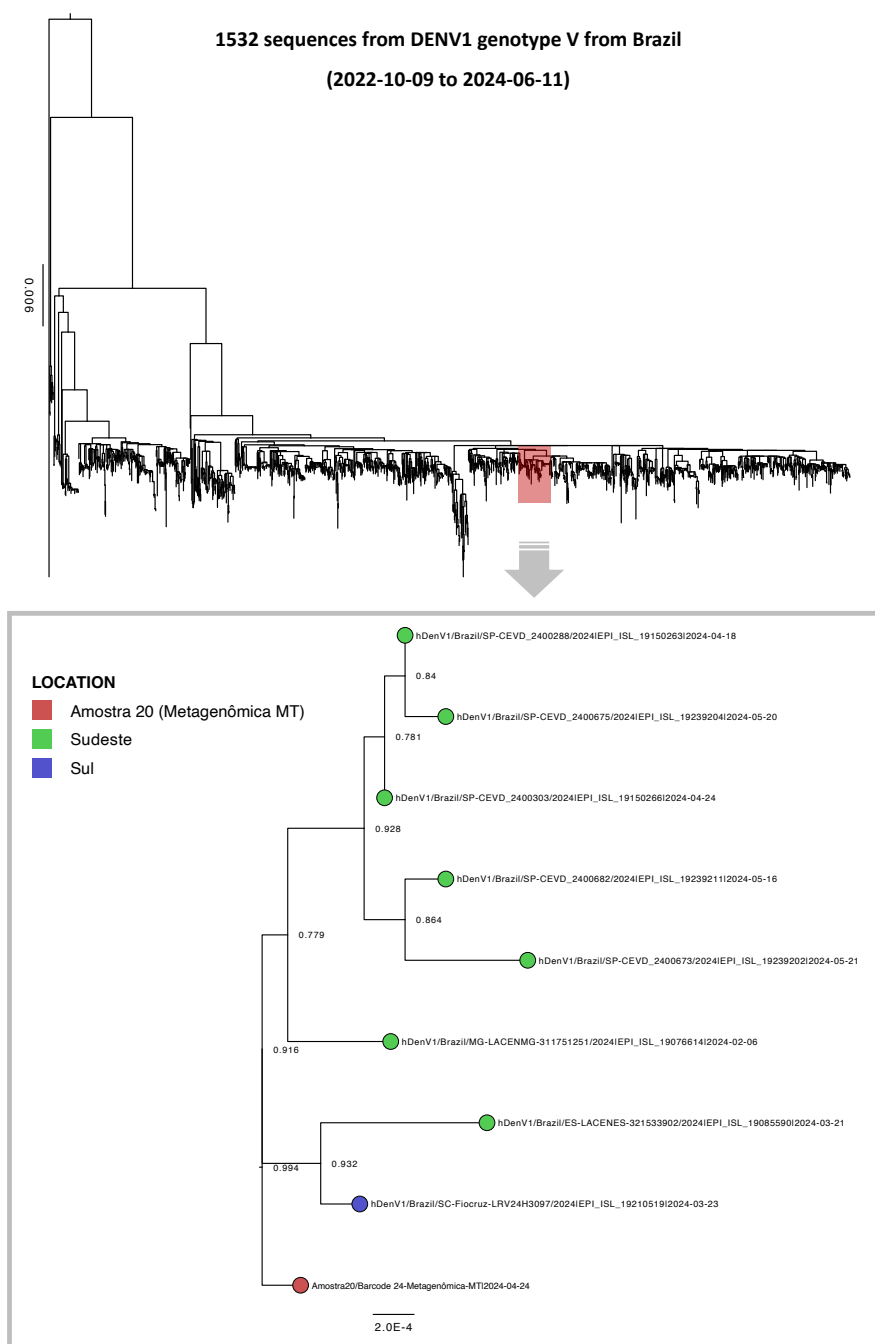


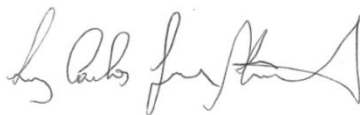
Figura 4 – Reconstrução filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) de sequências genômicas do vírus da dengue sorotipo 1, genótipo V (DENV1-V), incluindo o genoma gerado neste trabalho e 1,532 sequências de DENV1-V depositadas no banco de dados GISAID. As sequências representam as cinco grandes regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste) e foram coletadas entre outubro de 2022 e junho de 2024. A figura destaca a árvore de ML com o clado contendo a sequência de DENV1-V gerada no Mato Grosso. Os círculos representam diferentes sequências depositadas nos bancos de dados públicos de acordo com o local de coleta, com a legenda indicando as regiões específicas.

REFERÊNCIAS

CLARO, I. M. *et al.* Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Research*, v. 6, p. 241, 24 abr. 2023.

FOMSGAARD, A. S. *et al.* Improvements in metagenomic virus detection by simple pretreatment methods. *Journal of Clinical Virology Plus*, v. 2, n. 4, p. 100120, nov. 2022.

Belo Horizonte, MG, 19 de julho de 2024



Luiz Carlos Júnior Alcantara

Pesquisador Titular em Saúde Pública

Instituto René Rachou – Fiocruz Minas Gerais

Grupo de Mosquitos vetores: endossimbiontes e interação patógeno-vetor