



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIA FORATO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM
PACIENTES COM SÍNDROME FEBRIL EM RORAIMA

CAMPINAS

(2025)

JULIA FORATO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM
PACIENTES COM SÍNDROME FEBRIL EM RORAIMA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: PROF. DR. JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA JULIA FORATO E ORIENTADA
PELO PROF. DR. JOSÉ LUIZ PROENÇA
MÓDENA.

CAMPINAS

(2025)

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F74e Forato, Julia, 1996-
Epidemiologia molecular de arbovírus em pacientes com síndrome febril em Roraima / Julia Forato. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: José Luiz Proença Módena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Infecções por *Alphavirus*. 2. Arbovírus. 3. Epidemiologia molecular. I. Módena, José Luiz Proença, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Molecular epidemiology of arboviruses in patients with febrile illness in Roraima

Palavras-chave em inglês:

Alphavirus infections

Arboviruses

Molecular epidemiology

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Luiz Proença Módena [Orientador]

Helena Lage Ferreira

Rafael Elias Marques Pereira Silva

Data de defesa: 24-03-2025

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 3. Saúde e bem-estar

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6247-9657>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5211368464920203>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena

Profa. Dra. Helena Lage Ferreira

Prof. Dr. Rafael Elias Marques Pereira da Silva

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de **Dissertação** e na Secretaria do Programa de **Genética e Biologia Molecular** da Unidade do instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Alice e Davi José, e ao meu irmão Tiago, que me deram asas para sonhar e sempre me ampararam nos momentos de incerteza. À minha avó, Dona Cida, exemplo de força e resiliência, que sempre fez muito com tão pouco.

Com carinho e admiração,

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José (Zé) Luiz Proença Módena, por me acolher em seu laboratório, pela paciência, pelos ensinamentos e por todas as oportunidades. Obrigada também pelas conversas nos intervalos do café, que tantas vezes me ajudaram a descontraír ou desabafar. Um exemplo de profissional, sempre educado e de coração gigante, disposto a ajudar. Obrigada por acreditar em mim e por não me deixar desistir.

À professora Dr. Fabiana Granja, pela confiança, pelas correções e pelos constantes incentivos.

Ao professor Dr. William Marciel de Souza, pela paciência, disponibilidade e confiança, e por todas as oportunidades de colaborar e aprender. Obrigada pelos conselhos, tanto profissionais quanto sobre a vida, que foram essenciais nos momentos de dúvidas. Sua disposição para ajudar e seu compromisso em usar a ciência para tornar o mundo um lugar melhor são inspiradores.

Ao Gabriel, por todo apoio e carinho, sempre me incentivando e me fazendo acreditar novamente nos meus sonhos. Parceiro de bancada, sempre disposto a ajudar (nos experimentos com milhões de placas e nos horários mais inusitados). Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Natália, minha comparsa de PRNT, pela ajuda, amizade e parceria. E por todos os momentos de descontração e risadas durante as longas jornadas de NB3, tanto na pandemia quanto após ela.

Aos meus colegas de laboratório, tanto aos que já passaram pelo LEVE: Dr. Daniel, Dra. Mariene, Dra. Pierina (os “*levianos*” originais), Gabriela, Dra. Stefanie, Karina, Dr. Guilherme Milanez e Dr. Matheus Martini, quanto aos que ainda compartilham a bancada comigo: Aline, Camila, Paula, Priscilla e Bruno. Obrigada pela ajuda, pelo carinho e pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve.

Ao professor Dr. Marielton dos Passos Cunha, sempre disposto a ajudar e colaborar, e por compartilhar histórias que sempre rendem boas risadas.

Ao Dr. Gustavo Narvaes, pelos ensinamentos e por toda ajuda nos momentos de perrengue, salvando nossos experimentos.

Às meninas da limpeza, Vânia e Érica, sempre muito atenciosas e educadas, sempre me acompanhando bem cedinho no laboratório.

Ao LACEN-RR e à UFRR pelo fornecimento das amostras e das fichas de notificação essenciais para a execução deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2016/00194-8, 2020/04558-0 e 2022/10442-0 pelo fomento dos consumíveis e manutenção de toda a estrutura do laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo nº 88887-513498/2020-00.

Por fim, ao professor Dr. Rodrigo Angerami, aos médicos do HC-Unicamp, pelo tratamento humano dispensado aos pacientes, e ao Sistema Único de Saúde (SUS), por fornecer apoio e medicamentos de forma gratuita aos portadores de esclerose múltipla.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

Os arbovírus são transmitidos por artrópodes para vertebrados, e podem causar doenças humanas e veterinárias, com grande relevância econômica e de saúde pública, como os vírus da dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), que são transmitidos em ciclos urbanos, quanto vírus Mayaro (MAYV) e febre amarela (YFV) que são transmitidos em ciclos enzoóticos. Neste estudo, foi conduzida uma análise de epidemiologia molecular para avaliar a circulação ativa do MAYV e de outros arbovírus endêmicos em pacientes com doenças febris agudas, entre 2018 e 2021, no estado de Roraima, Brasil. Para isso, utilizamos a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR), sequenciamento de alto desempenho, e cultura celular. Detectamos RNA do MAYV em 3,4% (28/822) dos pacientes testados. Também isolamos e sequenciamos cepas de MAYV, confirmando que esses casos foram causados pelo genótipo D. Nossas análises filogenéticas demonstraram que as linhagens circulantes em Roraima se agrupam com aquelas identificadas no Peru e na Venezuela entre 1995 e 2010, sugerindo a prevalência do genótipo D na região Amazônica. Adicionalmente, detectamos RNA de CHIKV em 2% (16/822) e de DENV em 18,5% (152/822) dos pacientes, sendo 7,7% (63/822) atribuídos a DENV-1 e 10,8% (89/822) a DENV-2. Todas as amostras testaram negativo para ZIKV, vírus Oropouche e os sorotipos 3 e 4 de DENV. Assim, estes dados demonstraram a co-circulação ativa de MAYV, DENV e CHIKV em pacientes com doenças febris em Roraima. Esses resultados ressaltam a necessidade de fortalecer a vigilância epidemiológica e laboratorial contínua para determinar o impacto do MAYV na região Amazônica e sua possível circulação em ambientes urbanos.

Palavras-chave: Mayaro, arbovírus, epidemiologia molecular

ABSTRACT

Arboviruses are transmitted by arthropods to vertebrates and can cause human and veterinary diseases of significant economic and public health relevance. For example, dengue virus (DENV), chikungunya virus (CHIKV), and Zika virus (ZIKV) are transmitted in urban cycles. In contrast, the Mayaro virus (MAYV) and yellow fever virus (YFV) are transmitted in enzootic cycles. In this study, a molecular epidemiology investigation was conducted to assess the active circulation of MAYV and other endemic arboviruses in patients with acute febrile illnesses between 2018 and 2021 in Roraima, Brazil. For this purpose, we employed quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), high-throughput sequencing, and cell culture. We detected MAYV RNA in 3.4% (28/822) of the patients tested. We also isolated and sequenced MAYV strains, confirming that these cases were caused by genotype D. Phylogenetic analyses showed that the circulating strains in Roraima cluster with those identified in Peru and Venezuela between 1995 and 2010, suggesting the prevalence of genotype D in the Amazon region. Additionally, CHIKV RNA was detected in 2% (16/822) and DENV RNA in 18.5% (152/822) of the patients, with 7.7% (63/822) attributed to DENV-1 and 10.8% (89/822) to DENV-2. All samples tested negative for ZIKV, Oropouche virus, and DENV serotypes 3 and 4. These findings demonstrated the active co-circulation of MAYV, DENV, and CHIKV in patients with febrile illnesses in Roraima. The results emphasize the need to strengthen continuous epidemiological and laboratory surveillance to determine the impact of MAYV in the Amazon region and its potential circulation in urban environments.

Keywords: Mayaro, arbovirus, molecular epidemiology

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

°	Graus
%	Porcentagem
/	Divisão
μ	Micro
6K	Proteína 6K
ATCC	<i>“American Type Culture Collection”</i>
BFV	Vírus Barmah Forest
BHK-21	Fibroblastos renais de <i>Mesocricetus auratus</i>
BSA	Albumina de soro bovino
C	Proteína do capsídeo
C6/36	Células de larvas de <i>Aedes albopictus</i>
CCL-81	Células renais de <i>Cercopithecus aethiops</i>
CHIKV	Vírus Chikungunya
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Proteína do capsídeo
CPE	Efeito citopático
Ct	Limiar de ciclo <i>“Cycle threshold”</i>
DENV	Vírus Dengue
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
e	Equivalente
E	Proteína estrutural E
ECSA	East-Central-South-Africa
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
UFF	Unidades formadoras de foco
FNI	Ficha de notificação individual
IgG	Imunoglobulina G
JEV	Vírus da encefalite Japonesa

Km	Quilômetro
L	Litro
L-15	Meio Leibovitz
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
M	Proteína matriz
MAYV	Vírus Mayaro
ml	Mililitro
ML	Máxima verossimilhança
MOI	Multiplicidade de infecção
MSA	Alinhamento de sequência múltipla
N	Núcleo proteína
nsP	Proteína não estrutural
ONNV	Vírus O'nyong nyong
ORF	Quadros abertos de leitura " <i>Open reading frames</i> "
OROV	Vírus Oropouche
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Roraima
RRV	Vírus Ross River
RT	Transcrição Reversa
SFB	Soro fetal bovino
SLEV	Vírus da Encefalite de <i>Saint Louis</i>
UK	Reino Unido " <i>United Kingdom</i> "
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	Arbovírus e suas doenças	14
1.2.	Arbovírus e seus ciclos de transmissão.....	17
1.3.	Arbovírus emergentes e reemergentes	19
1.4.	Vírus Mayaro	22
1.5.	Roraima.....	25
2.	OBJETIVOS	29
2.1.	Objetivo geral	29
2.2.	Objetivos específicos.....	29
3.	MATERIAL E METODOS	30
3.1.	Delineamento experimental	30
3.2.	Coleta e processamento de amostras	31
3.3.	Comitê de Ética	32
3.4.	Vírus e células.....	32
3.5.	Extração dos ácidos nucleicos	32
3.6.	<i>Polymerase chain reaction quantitative real time</i> (RT-qPCR) MAYV, CHIKV, ZIKV, OROV e DENV1-4.	33
3.7.	Isolamento MAYV.....	34
3.8.	Sequenciamento do genoma do MAYV	34
3.9.	Análises filogenéticas	35
3.10.	Ensaio de imunofluorescência	35
3.11.	Análises de dados	36
4.	RESULTADOS	37
4.1.	Deteção de arbovírus	37
4.2.	Epidemiologia do vírus Mayaro	38
4.2.1.	Isolamento MAYV.....	40
4.2.2.	Sequenciamento MAYV.....	42
4.3.	Epidemiologia do CHIKV	44
4.4.	Epidemiologia do vírus Dengue.....	45
5.	DISCUSSÃO	48
6.	LIMITAÇÃO DO ESTUDO.....	51
7.	CONCLUSÃO	52
8.	REFERÊNCIAS.....	53
9.	ANEXOS	62
9.1.	Artigo da dissertação.....	62

9.2.	Artigos publicados no período	66
9.3.	Parecer comitê de ética.....	72
9.4.	Declaração de direitos autorais	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arbovírus e suas doenças

Arbovírus (*arthropod-borne viruses*) são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, como mosquitos, moscas e carrapatos (Young, 2018). A transmissão ocorre pela picada de um artrópode infectado em um vertebrado suscetível, que pode ser um humano, animal selvagem ou doméstico, denominado hospedeiro (Weaver e Barrett, 2004).

Os arbovírus estão distribuídos em todos os continentes, exceto na Antártida, onde as condições extremas de temperatura impedem a presença de vetores (Sukhralia *et al.*, 2019). A ocorrência de arbovírus é predominante em regiões de clima tropical e subtropical, que frequentemente são afetadas com surtos e epidemias devido à presença de vetores, população imunologicamente suscetível, e fatores ecológicos que favorecem a transmissão (Souza, de e Weaver, 2024).

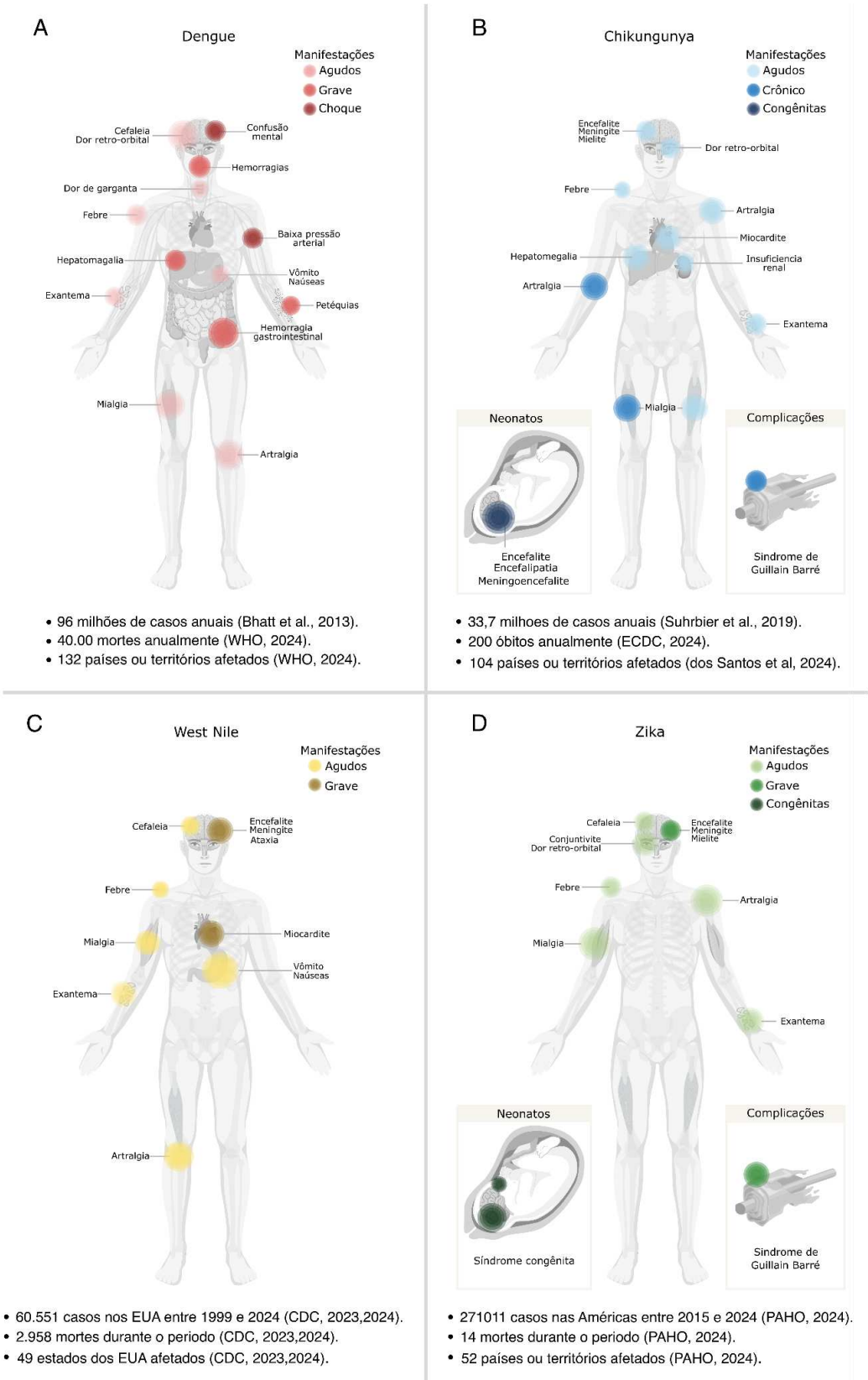
As infecções por arbovírus causam uma variedade de doenças veterinárias e humanas, e geralmente são assintomáticas, oligossintomáticas, ou associadas à doença febril leve (Weaver e Barrett, 2004). No entanto, algumas arboviroses podem progredir para síndromes graves, como doenças neurológicas (por exemplo, vírus do Nilo Ocidental [WNV]), febre hemorrágica (vírus da dengue [DENV]), poliartrite crônica (chikungunya [CHIKV]), abortos e distúrbios congênitos (vírus Zika [ZIKV]) (Burt *et al.*, 2017; Campbell *et al.*, 2002; Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2023; Mlakar *et al.*, 2016) (**Figura 1**). As arboviroses afetam desproporcionalmente populações vulneráveis em países de baixa e média renda, causando centenas de milhões de casos anualmente e sobrecarregando os sistemas de saúde de vários países (Donalisio, Freitas e Zuben, 2017).

Atualmente, DENV é o arbovírus com maior impacto na saúde pública mundial, com mais de 96 milhões de casos e 40.000 mortes anualmente em mais de 130 países (Bhatt *et al.*, 2013; Messina *et al.*, 2019; Sinha *et al.*, 2024; World Health Organization (WHO), 2017, 2024). Outro arbovírus com grande impacto é o CHIKV, que causa poliartralgia aguda e crônica em humanos, resultando em significativos encargos econômicos e de saúde pública (Burt *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2024; Suhrbier, 2019). O CHIKV causa 10 milhões de casos anuais, e quase 2,8 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2024; Nsoesie *et al.*, 2016; dos Santos, *et al.*, 2024). Outros arbovírus de grande importância para os humanos incluem vírus da febre amarela (YFV), ZIKV, WNV, e vírus da encefalite japonesa (JEV) (Pan American Health Organization (PAHO), 2024b; U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2024a; b; Weaver *et al.*,

2018). As arboviroses mais importantes de animais domésticos são a *African swine fever*, Rift Valley, doença da língua azul (*bluetongue*) e estomatite vesicular (Njau *et al.*, 2021; Saminathan *et al.*, 2020; Timoney, 2016; Tinto *et al.*, 2023).

Figura 1. Manifestações clínicas e síndromes graves associadas à infecção por arbovírus.

A infecção por arbovírus podem causar manifestações clínicas variadas, desde sintomas leves e inespecíficos na fase aguda até síndromes graves. Os sintomas agudos comuns incluem febre, cefaleia, artralgia, mialgia e erupções cutâneas. No entanto, cada arbovírus pode estar associado a manifestações e complicações específicas. **A.** Manifestações pelo DENV: Casos graves incluem quadros hemorrágicos, hepatomegalia e, em situações de choque, sintomas neurológicos, como confusão mental e convulsões, além de hipotensão arterial. **B.** Manifestações pelo CHIKV: Complicações associadas incluem manifestações neurológicas, Síndrome de Guillain-Barré, insuficiência renal, hepatomegalia e miocardite. Na fase crônica, a infecção é caracterizada por mialgia persistente e poliartralgia debilitante. Durante a gestação, o CHIKV pode atravessar a barreira hemato-placentária, causando encefalopatia, encefalite e meningoencefalite no feto. **C.** Manifestações pelo WNV: Casos graves podem levar à miocardite e manifestações neurológicas severas, como encefalite ou meningite. **D.** Manifestações pelo ZIKV: As complicações graves geralmente incluem manifestações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. A infecção pelo ZIKV durante a gestação pode resultar na síndrome congênita do Zika caracterizada por malformações cerebrais no feto, como microcefalia, e alterações oculares.



Legenda: EUA, Estados Unidos da América. Figura elaborada pelo autor. **Referências:** (Bhatt et al., 2013; Pan American Health Organization (PAHO), 2024a; b; Santos, dos et al., 2024; Suhrbier, 2019; U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2024a; b; World Health Organization (WHO), 2024).

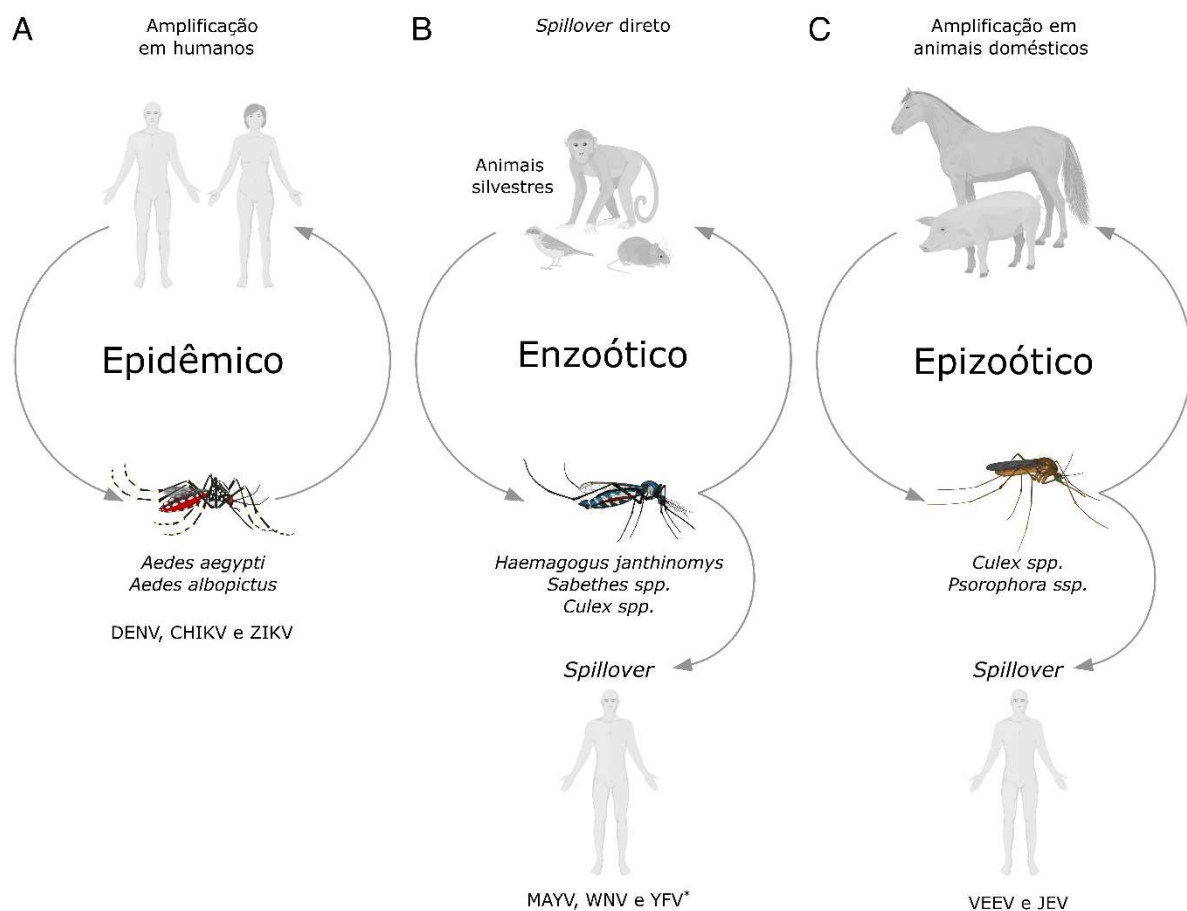
1.2. Arbovírus e seus ciclos de transmissão

Os arbovírus são mantidos por complexos ciclos envolvendo a replicação do vírus em vetores e hospedeiros vertebrados (Fernandez *et al.*, 2023). Quando a transmissão é mantida entre vetores e animais silvestres, esse ciclo é denominado de enzoótico (Weaver e Barrett, 2004). Ocasionalmente, o vírus pode saltar de hospedeiros silvestres em um processo conhecido como *spillover*, e causar infecção em animais domésticos e humanos (Coffey *et al.*, 2013). Esse evento caracteriza uma transmissão zoonótica (Valentine, Murdock e Kelly, 2019) (**Figura 2B**). Por exemplo, os vírus Mayaro (MAYV) e YFV são transmitidos em ambientes silvestres entre primatas não humanos e mosquitos silvestres, como *Haemagogus janthinomys* e *Sabethes spp* (Hoch *et al.*, 1981). A infecção humana por ambos os vírus ocorre de maneira acidental em áreas florestais onde esses vetores são comuns (Diagne *et al.*, 2020; Hoch *et al.*, 1981). A febre amarela pode ser prevenida pela vacinação desde a década de 1930 (Theiler e Smith, 1937; World Health Organization (WHO), 2017).

Humanos são geralmente hospedeiros finais, e na maioria das vezes, desenvolvem doença ao serem infectados (Weaver e Barrett, 2004). No entanto, eles podem atuar como hospedeiros finais e amplificadores de arbovírus transmitidos em ciclos urbanos, como o DENV, ZIKV e CHIKV (Weaver e Reisen, 2010). Esses vírus são transmitidos em ciclos humano-mosquito-humano, envolvendo principalmente vetores urbanos e periurbanos, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Weaver e Barrett, 2004) (**Figura 2A**). Estima-se que o custo global da gestão amplamente malsucedida de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* tenha sido de aproximadamente US\$ 149 bilhões entre 1970 e 2017 (Diagne *et al.*, 2021).

Os arbovírus também podem ter uma amplificação secundária em animais domésticos, resultando em surtos ou epidemias com ciclos epizoóticos (Jones *et al.*, 2008) (**Figura 2C**). Por exemplo, o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), pode causar surtos epizoóticos em equinos e humanos que desenvolvem doença neurológica grave, e podem resultar em casos fatais (Weaver *et al.*, 2004). Assim como o VEEV, o JEV circula em um ciclo enzoótico entre aves aquáticas e mosquitos, mas também pode ter um ciclo epizoótico em suínos em áreas rurais, onde esses animais atuam como amplificadores do vírus, contribuindo para sua disseminação (Weaver e Reisen, 2010).

Figura 2. Ciclos de transmissão de arbovírus. **A.** Ciclo epidêmico urbano. Neste ciclo, os humanos atuam como hospedeiros amplificadores em um ciclo humano-mosquito-humano, envolvendo mosquitos urbanos como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **B.** Ciclo enzoótico: a infecção de humanos ocorre por meio de um *spillover* direto, no qual um vetor enzoótico transmite o vírus de um hospedeiro enzoótico, geralmente animais silvestres, para o humano. * O YFV apresenta um ciclo enzoótico nas Américas e na África, sendo que ciclos epidêmicos urbanos têm sido observados principalmente no continente africano. **C.** Ciclo epizoótico. Esse ciclo tem animais domésticos com hospedeiros amplificadores, que facilitam o *spillover* direto para humanos.



Legenda: DENV: vírus da dengue; CHIKV: vírus chikungunya; ZIKV: vírus da zika; MAYV: vírus Mayaro; OROV: vírus Oropouche; WNV: vírus do Nilo Ocidental; YFV: vírus da febre amarela; VEEV: vírus da encefalite equina venezuelana; JEV: vírus da encefalite japonesa; Figura adaptada de (Weaver *et al.*, 2018).

1.3. Arbovírus emergentes e reemergentes

Os arbovírus são em sua maioria emergentes ou reemergentes. Vírus emergentes são aqueles que surgem pela primeira vez em uma população (humana ou de animais domésticos) ou em uma nova área geográfica, ou ainda, vírus previamente conhecidos que passam a infectar novas populações ou hospedeiros, causando surtos e epidemias, como o ZIKV (Jones *et al.*, 2008; Weaver e Barrett, 2004) (**Figura 3A**). Já os vírus reemergentes são definidos como patógenos previamente conhecidos que voltam a causar surtos após períodos de ausência de circulação ou baixa incidência (Jones *et al.*, 2008). Essa reemergência pode ocorrer devido ao surgimento de novas cepas, à redução na cobertura vacinal ou à introdução de vetores em áreas anteriormente não afetadas, por exemplo, CHIKV e YFV (Jones *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2021).

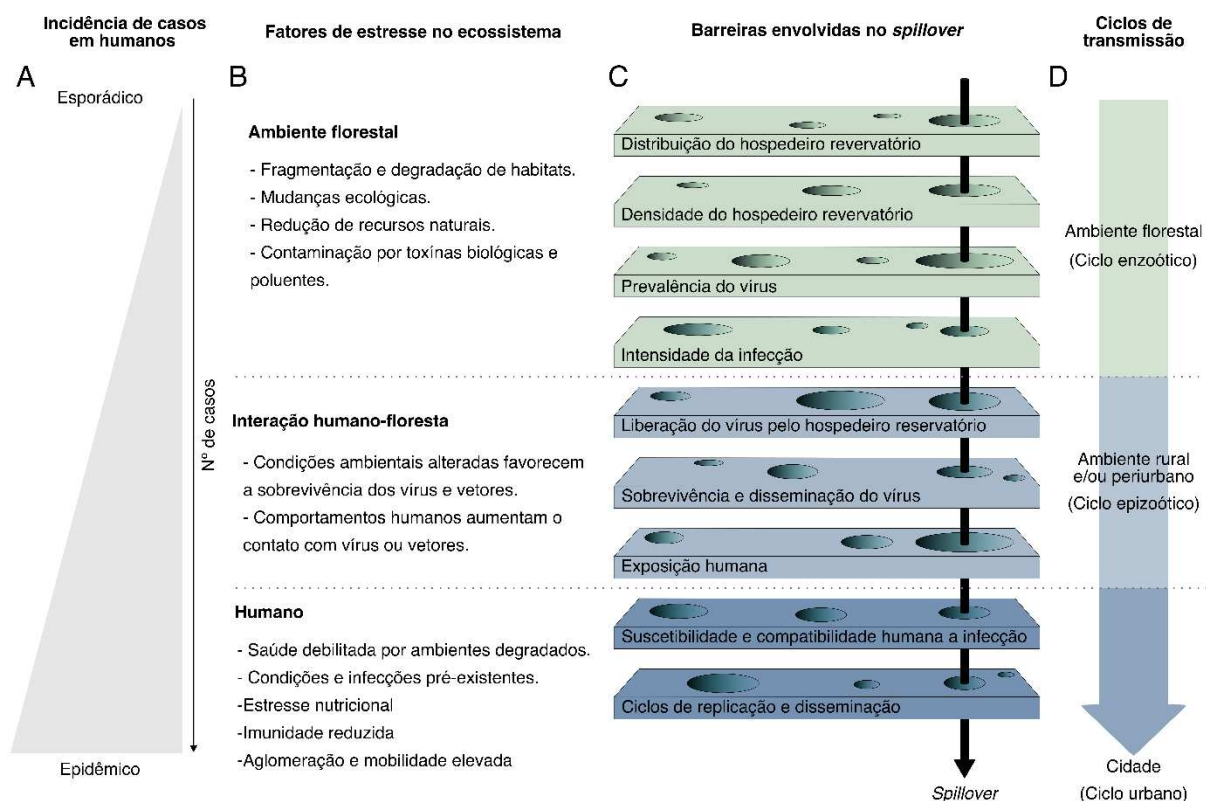
A circulação do CHIKV esteve inicialmente restrita a ciclos enzoóticos na África, em ambientes florestais e de savanas, envolvendo mosquitos silvestres, como *Aedes furcifer* e primatas não humanos e possivelmente outros animais selvagens (Zeller, Bortel, Van e Sudre, 2016). Em 2004, teve início uma epidemia desse vírus no Quênia, disseminando-se nos anos seguintes para países do Oceano Índico, da Ásia e Europa, chegando às Américas em 2013 (Freppel *et al.*, 2024). Nesses locais, o CHIKV adaptou-se aos mosquitos urbanos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, estabelecendo ciclos de transmissão em humanos, especialmente em países de clima tropical (Coffey *et al.*, 2013). O transbordamento (*spillover*) do vírus para ciclos urbanos provavelmente ocorreu devido ao trânsito de indivíduos virêmicos de ambientes florestais para áreas urbanas (Coffey *et al.*, 2013) (**Figura 3D**). Os processos de emergência e reemergência estão relacionados a modificações ambientais causadas por ações antrópicas e mudanças climáticas, que afetam a dinâmica de transmissão dos vírus (Fouque e Reeder, 2019; Weaver e Barrett, 2004) (**Figura 3B**). Modificações ambientais, como o desmatamento e a introdução de espécies não nativas (por exemplo, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), podem aumentar o risco de transmissão zoonótica de vírus ou adaptação para ciclos de transmissão urbanos, colocando populações suscetíveis em risco (Young, 2018) (**Figura 3C**).

Alterações climáticas também podem influenciar a competência e a capacidade vetorial, além de afetar o desenvolvimento do patógeno no vetor, um processo conhecido como incubação extrínseca, que impacta a transmissão da doença (Franklinos *et al.*, 2019). Os vetores são animais ectotérmicos que são sensíveis a variações da temperatura e umidade, que podem influenciar sua reprodução e desenvolvimento, afetando a taxa de transmissão dos vírus (Franklinos *et al.*, 2019;

Souza, de e Weaver, 2024). Os mosquitos, por exemplo, têm um ciclo de vida curto, e pequenas mudanças de temperatura ou umidade podem acelerar ou desacelerar seu ciclo de vida, e consequentemente afetar a dinâmica de transmissão dos arbovírus (Mordecai *et al.*, 2017).

As mudanças ambientais também podem impactar o ecossistema, e podem favorecer a reemergência de arbovírus como recentemente o vírus Oropouche (OROV) na América Latina e Caribe (Gräf *et al.*, 2024). Deste modo, esses vírus podem representar uma ameaça à saúde pública, onde essas modificações aumentam o contato entre os humanos e os vetores.

Figura 3. Fatores ambientais e suas consequências no processo de *spillover*. **A.** Incidência de casos em humanos associados ao *spillover*. A adaptação do patógeno a um novo hospedeiro suscetível, seguida de sua manutenção na população, pode levar à ampla disseminação e ao surgimento de epidemias. **B.** Fatores de estresse no ecossistema relacionados ao *spillover*. Alterações no ecossistema, como degradação de habitats, mudanças na disponibilidade de recursos e contaminação ambiental por toxinas biológicas e poluentes químicos, podem aumentar a interação entre vida selvagem e humanos, facilitando *spillover*. **C.** Barreiras que o vírus deve superar para que o *spillover* ocorra. O *spillover* depende do alinhamento de condições específicas para que o vírus seja transmitido de um hospedeiro reservatório para humanos. Esse processo exige superar barreiras, incluindo: distribuição e densidade dos hospedeiros reservatórios; quebra de barreiras imunológicas dos hospedeiros reservatórios; exposição e suscetibilidade humanas e o estabelecimento e transmissão sustentada entre humanos. **D.** Alterações nos ciclos de transmissão em decorrência do *spillover*. O *spillover* pode deslocar os ciclos de transmissão, promovendo a propagação do patógeno em novos contextos ecológicos e populacionais, potencializando riscos à saúde pública.



Legenda: Adaptado de (Plowright *et al.*, 2017, 2021)

1.4. Vírus Mayaro

O MAYV é um arbovírus negligenciado, membro da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, endêmico na América do Sul e no Caribe (Caicedo *et al.*, 2021). Ele foi identificado pela primeira vez em 1954, em indivíduos com doença febril em Trindade e Tobago (Anderson *et al.*, 1957). Desde então, casos autóctones foram relatados em mais de 11 países das Américas, incluindo surtos recentes no Brasil, Peru, Venezuela, Haiti e Guiana Francesa (Auguste *et al.*, 2015; Bonifay *et al.*, 2023; Diagne *et al.*, 2020; Halsey *et al.*, 2013; Lednicky *et al.*, 2016) (**Figura 4B**).

MAYV é envelopado, com capsídeo de formato icosaédrico e genoma linear de RNA de fita simples e polaridade positiva (Powers *et al.*, 2006). Seu genoma contém dois quadros de leitura abertos ("*Open Reading Frames*", ORFs), que codificam quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 e a RdRp) e cinco proteínas estruturais (CP, 6K, E1, E2 e E3), codificadas a partir de um RNAm subgenômico (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). As glicoproteínas E1 e E2 são usadas para a classificação e identificação dos seus genótipos (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018; Powers *et al.*, 2006). Até o momento, são descritos três genótipos do MAYV: Disseminado (D), Limitado (L) e Novo (N) (Auguste *et al.*, 2015). O genótipo D é amplamente disperso pela América do Sul e Caribe, circulando em países como Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela, Trindade e Tobago, e Guiana Francesa (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018; Tesh *et al.*, 1999). Por outro lado, o genótipo L apresenta circulação mais restrita, sendo encontrado principalmente na região centro-norte do Brasil e no Haiti (Lednicky *et al.*, 2016). Já o genótipo N, descrito recentemente, foi identificado apenas no Peru (Auguste *et al.*, 2015).

Além de suas características genéticas, o MAYV faz parte do Complexo Floresta Semliki, um grupo sorológico que inclui outros vírus artritogênicos, como o CHIKV, vírus Barmah Forest (BFV), vírus Ross River (RRV) e vírus O'nyong-nyong (ONNV) (Tesh *et al.*, 1999). Esses vírus compartilham sítios antigênicos, o que leva a diferentes graus de reatividade cruzada em testes sorológicos (Powers *et al.*, 2001). Essa propriedade sugere que a infecção por um desses vírus pode conferir algum nível de proteção cruzada entre os membros do complexo (Powers *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2024). Os vírus do Complexo Floresta Semliki podem causar doenças semelhantes caracterizadas por febre aguda associada com manifestações musculoesqueléticas (Casals e Whitman, 1957).

Atualmente, o Brasil concentra o maior número de infecções pelo vírus MAYV, com casos ocorrendo principalmente na região Amazônica e Centro Oeste, onde a incidência é maior durante a estação chuvosa (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018; Caicedo

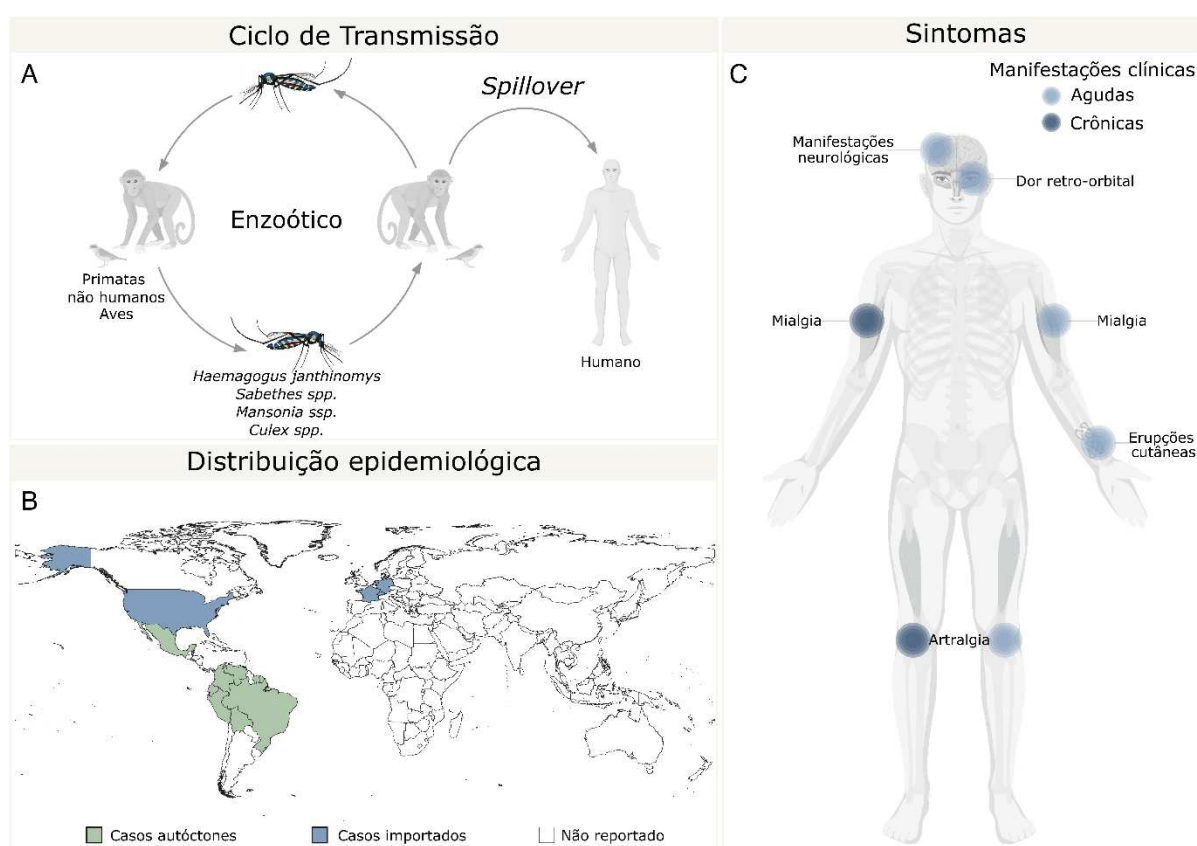
et al., 2021). Desde sua detecção em humanos no Brasil, em 1957 no Pará, o MAYV tem sido responsável por surtos recorrentes, incluindo um importante surto envolvendo os vírus MAYV e YFV na cidade de Belterra, no Pará, em 1978 (Caicedo *et al.*, 2021; Causey O.R. e Maroja A.M., 1957; Hoch *et al.*, 1981; Vieira *et al.*, 2015). Embora surtos por MAYV tenham sido registrados em várias regiões, a circulação do vírus em populações humanas permanece relativamente limitada, e acredita-se que os casos sejam subnotificados.

Sua transmissão ocorre principalmente em ciclo enzoótico entre mosquitos silvestres, como *Haemagogus janthinomys* e primatas não humanos, como *Callithrix argentata*, em áreas florestais ou ambientes rurais próximos a zonas de mata (LeDuc, Pinheiro e Rosa, da, 1981) (**Figura 4A**). Este ciclo pode envolver hospedeiros secundários, como aves, roedores e preguiças (Celone *et al.*, 2021). A infecção humana é acidental e geralmente associada a atividades ocupacionais ou recreativas em áreas florestais (Powers *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2015). Alguns estudos demonstraram que mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* têm a capacidade de transmitir o MAYV em condições de laboratório, sugerindo um potencial efeito da introdução do vírus em ambientes urbanos assim como ocorrido com o CHIKV (Fernandez *et al.*, 2023; Weaver, 2013).

Assim como o CHIKV e outros alfavírus, a infecção pelo MAYV pode causar uma doença artrítogênica debilitante, podendo se apresentar de forma aguda ou crônica (Caicedo *et al.*, 2021). Alguns pacientes são assintomáticos ou oligossintomáticos (Diagne *et al.*, 2020). Durante a fase aguda os pacientes desenvolvem febre superior a 39°C que dura de 3 a 5 dias em média, além de cefaleia, dor retro-orbital, poliartralgia e poliartrite debilitantes, seguidas de erupções cutâneas (Tesh *et al.*, 1999) (**Figura 4C**). Essas condições geralmente são autolimitadas (Tesh *et al.*, 1999). Nos casos crônicos, a poliartralgia e poliartrite podem ser incapacitantes e durar meses ou até anos (Hoch *et al.*, 1981). Manifestações graves, como miocardite, quadros hemorrágicos e doenças do sistema nervoso central têm sido documentadas (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

Atualmente, não há antivirais ou vacinas específicas para o tratamento da febre Mayaro, a terapia se concentra no controle dos sintomas, com o uso de analgésicos, anti-inflamatórios e antitérmicos (Pan American Health Organization (PAHO), 2019). A ausência de tratamentos específicos somados à semelhança dos sintomas da febre Mayaro com outras doenças virais que co-circulam na mesma área, torna o diagnóstico e o manejo dessa infecção particularmente desafiadores, e reforça a necessidade de diagnósticos diferenciais. Atualmente a prevenção da infecção por MAYV limita-se ao controle do contato entre humanos e vetores (Diagne *et al.*, 2020).

Figura 4. Características da transmissão, distribuição e sintomatologia do MAYV. **A.** Ciclo de transmissão: ocorre em um ciclo enzoótico envolvendo mosquitos silvestres, primatas não humanos, aves e roedores. A transmissão para humanos ocorre por meio de *spillover* direto, geralmente associado a atividades em zonas de mata ou ambientes periurbanos. **B.** Distribuição e caracterização dos casos: MAYV é endêmico em regiões da América do Sul e Caribe. Casos importados também foram relatados em países da América do Norte e Europa, destacando o potencial de disseminação em áreas não endêmicas. **C.** Manifestações clínicas: na fase aguda, a infecção pelo MAYV causa febre, mialgia, poliartralgia, erupção cutânea e outras manifestações dérmicas. Na fase crônica, os sintomas predominantes são mialgia e poliartralgia, que podem persistir por meses ou anos.



Legenda: Figura elaborada pelo autor.

1.5. Roraima

O estado de Roraima, localizado no extremo norte do Brasil, faz fronteira com a Guiana e a Venezuela, o que lhe confere características geográficas únicas que o diferenciam do restante do país (Miranda e Absy, 2000). Suas condições climáticas e geográficas, associadas aos altos índices pluviométricos, favorecem a manutenção de uma ampla diversidade de biomas que funcionam como reservatórios para uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados e artrópodes hematófagos (Lopes, Nozawa e Linhares, 2014). Entre estes, destacam-se mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Hemagogus*, além de moscas do gênero *Culicoides*, vetores de diversos arbovírus.

A combinação dessas características com o intenso fluxo humano, comercial e migratório, envolvendo tanto estrangeiros quanto populações indígenas, torna Roraima especialmente vulnerável à introdução e disseminação de arboviroses (Acosta *et al.*, 2012). Essa vulnerabilidade é agravada pelos sérios problemas ambientais enfrentados pelo estado, como a mineração e o extrativismo ilegal de madeira, particularmente em territórios indígenas (Ribas, 2018). A degradação ambiental resultante dessas atividades, somada à mobilidade populacional impulsionada pelas relações comerciais e agravada por crises humanitárias nos países vizinhos da tríplice fronteira, cria condições propícias para a proliferação de vetores e a disseminação de arbovírus (Basta, 2023).

Historicamente, Roraima é considerado uma porta de entrada para a introdução de vírus no Brasil (**Figura 5**). Na década de 1980, a capital, Boa Vista, registrou os primeiros casos de dengue causados pelos sorotipos 1 e 4 (DENV-1 e DENV-4), que posteriormente se espalharam para outras regiões do país (Acosta *et al.*, 2011; Osanai *et al.*, 1983). Em julho de 2010, foi relatada a reintrodução do sorotipo 4, possivelmente proveniente do Caribe, em especial da Venezuela ou da Guiana, países que compartilham fronteiras e mantêm relações comerciais com Roraima (Acosta *et al.*, 2011; Naveca *et al.*, 2012).

Além disso, o estado é endêmico para o vírus da febre amarela (YFV) e já enfrentou epidemias de chikungunya (CHIKV) em 2014 e 2018, de zika vírus (ZIKV) em 2017 e, mais recentemente, surtos de Oropouche vírus (OROV) (Hayd *et al.*, 2020; Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2018; Naveca *et al.*, 2024; Roraima, 2018; Scachetti *et al.*, 2024). A introdução e reintrodução frequente dos quatro sorotipos de dengue consolidam Roraima como uma região hiperendêmica para DENV (Acosta *et al.*, 2012, 2014; Hayd, Caldart e Louzada, 2021; Siqueira, T. *et al.*, 2009; Siqueira, T. C. S. *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2024). Nesse cenário, o Ministério da Saúde recomenda o uso de critérios clínico-epidemiológicos para o diagnóstico de dengue em áreas em

epidemias (Ministério da Saúde, 2009). Essa estratégia reduz significativamente os custos associados a testes diagnósticos para arboviroses e minimiza o tempo de espera por atendimento médico. No entanto, ela não é precisa, já que muitas arboviroses compartilham sintomas, o que pode favorecer a circulação silenciosa de outros vírus e dificultar a adoção de medidas de contenção adequadas.

A grande circulação de arbovírus em Roraima, a probabilidade desse estado de servir de porta de entrada para a disseminação de novos vírus em território nacional e problemas relacionados a vigilância epidemiológica, fazem de Roraima um local particularmente propenso à circulação silenciosa de vírus enzoóticos com potencial emergente, como MAYV e OROV. Ou seja, partimos da hipótese que MAYV ou outros vírus negligenciados possam estar circulando de forma silenciosa em Roraima. A detecção e caracterização desses vírus no Estado podem fornecer informações epidemiológicas e genômica cruciais para o entendimento da disseminação, evolução e filodinâmica desses vírus no Brasil, assim como para o planejamento de estratégias de contenção em outras regiões do nosso país. Assim, buscamos avaliar a presença de arbovírus com registros recentes de circulação no país em amostras de pacientes com doença febril aguda provenientes de Roraima, a fim de compreender melhor a dinâmica de circulação desses vírus na Região Amazônica e subsidiar ações de vigilância e controle.

Figura 5. Histórico epidemiológico das arboviroses em Roraima entre 1981 e 2024.

Historicamente, Roraima tem sido uma porta de entrada para a introdução de vírus no Brasil, com registros da circulação dos vírus da dengue, Chikungunya, Zika, Febre Amarela, entre outros. Esse cenário é influenciado por fatores ambientais e sociais, além da degradação ambiental, que favorece a manutenção e disseminação de arbovírus.

Histórico das arboviroses e emergências sanitárias em Roraima (1981-2024)

1981-1982		Primeiro surto de dengue no Brasil, com introdução dos sorotipos 1 e 4 no município de Boa Vista (Osanai et al., 1983).
1982-1986		Campanhas de erradicação do <i>Aedes aegypti</i> e vacinação contra a febre amarela (Roraima, 2018).
1992-1996		Reintrodução do <i>Aedes aegypti</i> no estado devido a falhas dos programas de controle e vigilância (Roraima, 2018).
1998		Surto de febre amarela e intensificação da campanha de vacinação (Roraima, 2018).
1997-2007		Epidemias de dengue causadas pela introdução dos sorotipos 2 e 3 (Hayd, Caldart e Louzada, 2021; Siqueira et al., 2011).
2007-2009		Deteção da co-circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 do dengue (Roraima, 2018).
2010		Reintrodução do sorotipo 4 do dengue no Brasil, pelos municípios de Boa Vista e Cantá, possivelmente vindo da Venezuela (Acosta et al., 2011).
2014		Introdução do genótipo asiático do vírus Chikungunya (CHIKV), possivelmente vindo do Nordeste do Brasil (Naveca et al., 2019).
2015		Introdução do vírus Zika (ZIKV), com registros de casos de microcefalia (Roraima, 2018).
2016		Introdução do genótipo africano ECSA do CHIKV, vindo do Nordeste (Naveca et al., 2019).
2017		Surto do ZIKV (Roraima, 2018).
		Crise humanitária intensifica a migração venezuelana para o estado, sobrecarregando os sistemas de saúde (Ribas, 2018).
2017-2018		Epidemia de CHIKV causada pela linhagem ECSA (Naveca et al., 2019).
2019-2022		Crise humanitária na população indígena Yanomami (Basta, 2023).
2020		A OMS declara como pandemia de Covid-19 a infecção causada pelo SARS-CoV2 (WHO, 2020).
2020-2021		Deteção de casos de Mayaro (MAYV) em amostras de pacientes febris (Forato et al., 2024).
2023		Deteção de casos de MAYV e do vírus Oropouche (OROV) pelo LACEN/RR (Roraima, 2024).
2024		Surto de OROV (Naveca et al., 2024).

Legenda: DENV: vírus da dengue; CHIKV: vírus chikungunya; ZIKV: vírus da zika; MAYV: vírus Mayaro; OROV: vírus Oropouche; ECSA: *East-Central-South-African* (Leste-Centro-Sul-Africano); OMS: Organização Mundial da Saúde; SARS-CoV2; *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Síndrome respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2); Covid-19: *Coronavirus disease 2019* (Doença por coronavírus 2019); LaCen/RR: Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima. Figura elaborada pelo autor. **Referências:**(Acosta et al., 2011; Basta, 2023; Forato et al., 2024; Hayd, Caldart e Louzada, 2021; Naveca et al., 2018, 2024; Osanai et al., 1983; Ribas, 2018; Roraima, 2018; Secretaria de Saúde do Estado de Roraima, 2024; Siqueira, T. et al., 2009; WHO, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a circulação ativa do MAYV e outros arbovírus (OROV, CHIKV, ZIKV e DENV) em pacientes com doenças febris agudas entre 2018 e 2021 em Roraima, Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar o RNA de MAYV, CHIKV, ZIKV, OROV e DENV1-4 em amostras séricas de pacientes com síndrome febril em Roraima.
- Isolar MAYV a partir de amostras de pacientes com síndrome febril em Roraima.
- Caracterizar os aspectos genômicos e evolutivos do MAYV detectados em Roraima.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Delineamento experimental

Foram coletadas amostras de soro de 822 pacientes com síndrome febril aguda atendidos em unidades básicas de saúde de Roraima, entre 2018 e 2021. A partir dessas amostras, realizamos a extração do RNA viral, seguida da detecção de MAYV, CHIKV, ZIKV, OROV e dos quatro sorotipos de DENV por PCR em tempo real. Os soros de pacientes positivos para MAYV com valores de CT <30 foram utilizados para o isolamento viral em culturas de células. A confirmação dos isolamentos foi realizada por RT-qPCR e ensaios de imunofluorescência. Em seguida, empregamos a técnica de sequenciamento por nanoporos para obter as sequências virais, que foram analisadas por métodos filogenéticos baseados na máxima verossimilhança (**Figura 6**).

Figura 6: Fluxograma do delineamento experimental realizado. 1. Coleta e processamento de amostras; 2. Extração ácidos nucleicos; 3. RT-qPCR para detecção do MAYV, CHIKV, OROV, ZIKV e DENV 1-4; 4. Isolamento do MAYV em células Vero CCL-81; 5. RT-qPCR para confirmação do isolamento; 6. Ensaio de imunofluorescência para MAYV; 7. Sequenciamento do genoma do MAYV pela plataforma *Oxford Nanopore*; 8. Análises filogenéticas.

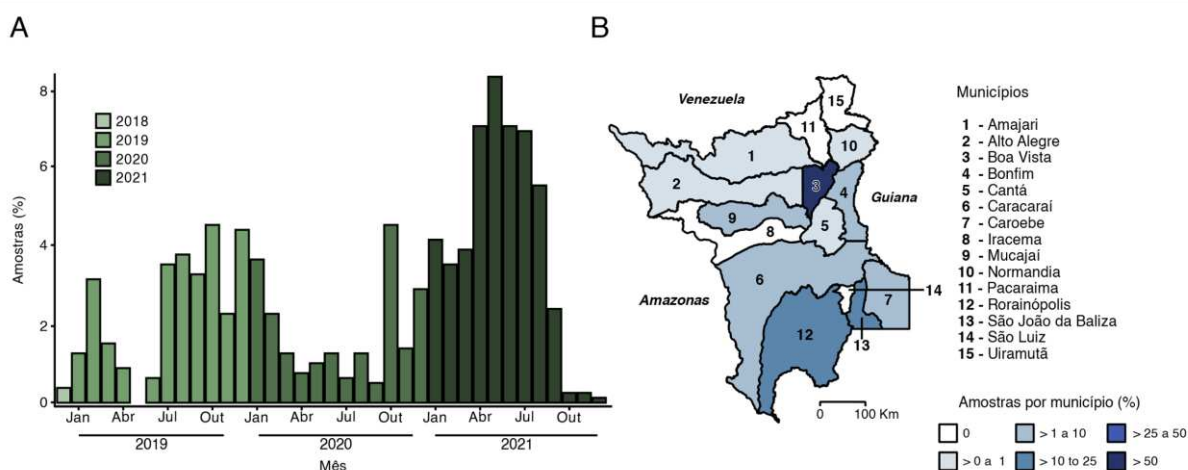


Legenda: MAYV: vírus Mayaro, CHIKV: vírus Chikungunya, ZIKV: vírus Zika, DENV-1: sorotipo 1 do vírus Dengue e DENV-2: sorotipo 2 do vírus Dengue, DENV-3: sorotipo 3 do vírus Dengue e DENV-4: sorotipo 4 do vírus Dengue, RT-qPCR: *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*.

3.2. Coleta e processamento de amostras

Amostras de sangue de pacientes, com doença febril aguda, com até 10 dias após o início dos sintomas, foram coletadas entre dezembro de 2018 e dezembro de 2021, por punção venosa em unidades básicas de saúde de 11 dos 15 municípios do estado de Roraima, Brasil, (**Figura 7**). Foram considerados apenas os municípios onde ocorreram as notificações dos casos. As amostras foram enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública para investigação do agente etiológico. Para este estudo, foram disponibilizadas amostras residuais de soro de 822 pacientes, com volumes entre 0,2 e 2 ml, que testaram negativo para malária. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C , e os estudos foram realizados em ambiente de biossegurança nível 2. As informações dos pacientes, incluindo sexo, idade, ocupação, dados de coleta das amostras, sintomatologia, data do início dos sintomas foram coletadas das fichas de notificação individuais (FNI), fornecidas de forma digital pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima (LACEN-RR). Os dados de geolocalização dos casos positivos para os vírus investigados foram obtidos usando o Google Earth v.10.55.0.1, com base nas informações de endereço fornecidas nas FNI.

Figura 7. Distribuição temporal e geográfica das amostras de pacientes com síndrome febril aguda no Estado de Roraima, Brasil. A. Percentual de amostras coletadas de pacientes com síndrome febril aguda por mês em Roraima entre 2018 e 2021. **B.** Porcentagem de amostras coletadas por município entre 2018 e 2021. Amajari (0,4%, 3/822), Alto Alegre (0,5%, 4/822), Boa Vista (52,6%, 384/822), Bonfim (5,5%, 40/822), Cantá (0,5%, 4/822), Caracarái (3,2%, 23/822), Caroebe (1,1%, 8/822), Mucajaí (1,8%, 13/822), Normandia (0,7%, 5/822), Rorainópolis (23,6%, 172/822) e São João da Baliza (10,1%, 74/822). Não foram recebidas amostras de Iracema, Pacaraima, São Luiz e Uiramutã. Em adição, 11,2% (92/822) pacientes não tinham informação sobre o município de residência.



3.3. Comitê de Ética

Todos os experimentos foram conduzidos após a aprovação dos comitês de ética pela Universidade Federal de Roraima (nº 2.881.239) (**Anexo 1**) e pela Universidade Estadual de Campinas (nº 5.625.875) (**Anexo 2**).

3.4. Vírus e células

Foram utilizadas as linhagens celulares: Vero ATCC CCL81 (células renais de *Cercopithecus aethiops*), C6/36 ATCC CRL 1660 (células de larvas de *Aedes albopictus*) e BHK-21 (C-13) ATCC CRL-8544 (células de fibroblastos renais de *Mesocricetus auratus*). As células Vero CCL81 e BHK-21 foram cultivadas em meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) de baixa glicose (Vitrocell Embriolife, BR), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife, BR), e 1% de uma solução de penicilina (10.000 unidades/ml) e estreptomicina (10.000 µg/ml) (Gibco, EUA), mantidas a 37°C em 5% de CO₂. As células C6/36 foram cultivadas em meio Leibovitz (L-15) com L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de SFB e 1% de solução de penicilina/estreptomicina, e mantidas a 28°C em ausência de CO₂. Como controles positivos para os ensaios, foram utilizados os seguintes vírus: MAYV das cepas BeAr 20290 e IQT 4235, CHIKV cepa S27, ZIKV cepa MR 766, OROV cepa BeAn 19991 e DENV-1 cepa Mochizuki, DENV-2 cepa NGC, DENV-3 cepa H87, DENV-4 cepa (**Tabela 1**).

Tabela 1. Lista das células e meios de cultivos usadas na produção dos estoques virais.

Célula	Vírus	Meio de cultivo
Vero ATCC CCL81	MAYV, CHIKV, OROV	DMEM
C6/36 ATCC CRL 1660	ZIKV	Leibovitz (L-15)
BHK-21 (C-13) ATCC CRL-8544	DENV 1-4	DMEM

3.5. Extração dos ácidos nucleicos

O RNA viral das amostras foi extraído com o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, EUA) e o *Quick-RNA Viral Kit* (Zymo, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os extratos de RNA foram analisados no espectrofotômetro *NanoDrop™ One/One* (Thermo Fisher Scientific, EUA) para verificar a concentração e a pureza do RNA obtido. Consideramos puros os ácidos nucleicos que apresentaram leituras de

absorbâncias em 260/280 próximas a 2 e leituras em 260/230 entre 2 e 2,2, conforme as especificações do fabricante.

3.6. *Polymerase chain reaction quantitative real time (RT-qPCR) MAYV, CHIKV, ZIKV, OROV e DENV1-4.*

Os ácidos nucleicos foram testados com RT-qPCR para investigar a presença do RNA dos MAYV, CHIKV, ZIKV, OROV e DENV1-4, utilizando os kits *TaqMan RNA to-Ct 1-Step* (Applied Biosystems, EUA) e *qPCRBIO Probe 1-Step Go Lo-ROX* (PCRBiosystems, UK) (**Tabela 2**). As reações foram realizadas no QuantStudio 3, com 45 ciclos de amplificação e 60°C de temperatura de anelamento e extensão (Applied Biosystems, EUA).

Tabela 2. Lista de sondas e primers para detecção de arbovírus.

Vírus	Sequências (5'→3')	Primers e sonda	Alvo	Posição no genoma	Ref.
MAYV	AAGCTCTTCTCTGCATTGC	Forward	NSP1	51-70	(Waggoner <i>et al.</i> , 2018)
	TGCTGGAAACGCTCTCTGTA	Reverse1	NSP1	141-160	
	TGCTGGAAATGCTCTTTGTA	Reverse2		141-160	
	GCCGAGAGCCCGTTTTTAAAATCA	Probe		116-140	
CHIKV	AAAGGGCAAACCTCAGCTTCAC	Forward	NSP1	874-894	(Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)
	GCCTGGGCTCATCGTTATTC	Reverse	NSP1	961-942	
	CGCTGTGATACAGTGGTTTCGTGTG	Probe		899-923	
ZIKV	AARTACACATACCARAACAAAGTGGT	Forward	NSP5	9365-9390	(Balm <i>et al.</i> , 2012)
	TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG	Reverse	NSP5	9466-9446	
	CTYAGACCAGCTGAAR	Probe		9398-9413	
OROV	TACCCAGATGCGATCACCAA	Forward	N	356-375	(Souza Luna, de <i>et al.</i> , 2017)
	TTGCGTCACCATCATTCCAA	Reverse	N	437-456	
	TGCCTTTGGCTGAGGTAAAGGGCT	Probe		409-433	
DENV1	GACACCACCCCTTTGGACAA	Forward	NSP5	8586-8606	(Callahan <i>et al.</i> , 2001)
	CACYTGGGCTGTACCTCCAT	Reverse	NSP5	8692-8673	
	AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCG	Probe		8608-8638	
DENV2	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	Forward	M	1605	(Johnson, Russell e Lanciotti, 2005)

	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	Reverse	M	1583	
	CTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	Probe		1008	
DENV3	GGGAAAACCGTCTATCAATA	Forward	C	118-221	(Callahan <i>et al.</i> , 2001)
	CGCCATAACCAATTTTCATTGG	Reverse	C	241-221	
	CACAGTTGGCGAAGAGATCTCAAGAGGA	Probe		174-202	
DENV4	TGAAGAGATTCTCAACCGGAC	Forward	C	187-207	(Callahan <i>et al.</i> , 2001)
	AATCCCTGCTGTTGGTGGC	Reverse	C	293-275	
	TCATCAGTTTTTTCGAGTCCTTTCCA	Probe		247-273	

Legenda: MAYV, vírus Mayaro. CHIKV vírus Chikungunya. ZIKV, vírus Zika. OROV, vírus Oropouche. DENV, vírus da Dengue. NSP1, proteína não estrutural. NSP5, proteína não estrutural 5. M, proteína matriz. C, proteína do capsídeo. 1. N, nucleoproteína.

3.7. Isolamento MAYV

As amostras positivas para o MAYV por RT-qPCR, foram inoculadas em células Vero CCL-81 para isolamento viral. As células foram cultivadas em placas de seis poços a uma concentração de 1×10^6 células/ml (1×10^6 células por poço) em meio DMEM (Vitrocell Embriolife, BR), suplementado com 10% de SFB (Vitrocell Embriolife, BR) e 1% de uma solução de penicilina (10.000 unidades/ml) e estreptomicina (10.000 µg/ml). Após o cultivo, as amostras de soro foram diluídas em uma proporção de 1:10 em DMEM, com 2% de penicilina e estreptomicina (Gibco, EUA), e adicionadas à monocamada celular. Após uma hora de incubação a 37°C para adsorção, o inóculo foi removido e a monocamada mantida em DMEM suplementado com 5% de SFB. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e monitoradas até que o efeito citopático (CPE) se tornasse visível ao microscópio óptico. O sobrenadante foi coletado e submetido a RT-qPCR (Waggoner *et al.*, 2018) para confirmar o isolamento viral, identificado por uma diminuição no valor de limiar de ciclo “*Cycle threshold value*” (Ct). Para avaliar um possível aumento da carga viral foi feito uma análise de equivalente de unidades formadoras de foco por ml “*Focus-Forming Units*” (eFFU/ml), baseada no número de cópias de RNA por ml de amostra.

3.8. Sequenciamento do genoma do MAYV

O sequenciamento do genoma do MAYV foi realizado com amostras e isolados com valores de Ct < 30 utilizando o protocolo *Rapid SMART-9N* com a plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies, UK), conforme descrito em (Claro

et al., 2021). Os arquivos FAST5 gerados passaram por processo de atribuição de nucleobases (*basecalling*), em seguida foram desmultiplexados e cortados usando *Guppy* versão 9.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Os arquivos com *barcodes* foram alinhados ao genoma de referência do MAYV (GenBank acesso no. NC_003417) usando *Minimap2* v.2.17.r941 (Li, 2018) e convertido em arquivos BAM usando *SAMtools* (Li *et al.*, 2009) *Medaka_variants* foram empregues para chamada de variantes, seguidos por *Medaka_consensus* (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) para construção de sequências de consenso. As regiões do genoma com cobertura inferior a 20× foram representadas pela letra "N". As estatísticas do genoma foram calculadas usando o *NanoStat* versão 1.6.0, *Samtools stats* e *samtools depth* (de Coster *et al.*, 2018).

3.9. Análises filogenéticas

Os genomas do MAYV com cobertura superior a 90% foram gerados e alinhados com cepas não redundantes de MAYV, com sequências das regiões codificadoras completas disponíveis no banco de dados GenBank até 15 de setembro de 2023. Um alinhamento de sequência múltipla (MSA) foi realizado utilizando o *MAFFT*, versão 7.450 (Kato e Standley, 2013), com ajustes manuais feitos no *Geneious Prime* 2023.0.4. O conjunto de dados foi examinado para eventos de recombinação por meio de todos os métodos disponíveis no *RDP*, versão 4 (Martin *et al.*, 2015). Em seguida, foi construída uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) utilizando o *IQ-TREE*, versão 2, sob o modelo GTR + I + γ , determinado pelo *ModelFinder* (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2015). O suporte estatístico dos nós da filogenia de ML foi avaliado com a abordagem ultrafast-bootstrap, utilizando 1.000 réplicas. A árvore filogenética foi visualizada no *FigTree* v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.10. Ensaio de imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram feitos com o isolado MAYV #1, proveniente do paciente RR-736. Células Vero CCL-81 foram cultivadas em *Chambers slides* a uma concentração de 5×10^5 células/ml (1×10^5 células/poço) em DMEM (Vitrocell Embriolife, BR), suplementado com 10% de SFB (Vitrocell Embriolife, BR) e uma mistura 1:1 de penicilina (10.000 unidades/ml) e estreptomicina (10.000 μ g/ml) (Gibco, EUA) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas com o isolado MAYV #1 por 1 hora, utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Para o ensaio, as células foram inicialmente bloqueadas com uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Aldrich, EUA) a 5%, seguida da

incubação com a solução *BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution* (Becton Dickson, EUA). Seguidamente foram utilizados, os anticorpos primários, anti-Mayaro vírus E2, clone MAY-134 (Merck, EUA) para marcação do vírus, e o anticorpo anti-vimentina (ABCAM, EUA) para marcação dos filamentos intermediários, ambos na diluição de 1:100, incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos secundários, *goat anti-rabbit IgG AF750* (ABCAM, EUA) e *goat anti-mouse IgG AF594* (Thermo Fisher Scientific, EUA), ambos na diluição de 1:500, por 1 hora à temperatura ambiente, protegidos da luz. A coloração nuclear foi realizada com o corante Hoechst, adicionado por 20 minutos à temperatura ambiente, também protegido da luz. Por fim, as lamínulas foram montadas com o meio de montagem Fluoromount-G (Invitrogen, EUA), e as imagens foram adquiridas com um microscópio confocal Leica TCS SP5 II, com aumento de 20×, no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

3.11. Análises de dados

Os resultados obtidos foram analisados e representados graficamente utilizando os pacotes no R Studio v.4.3.0, no GraphPad Prism v8, Fiji v2.14.0 e foram posteriormente ajustados com o Inkscape v.1.3.

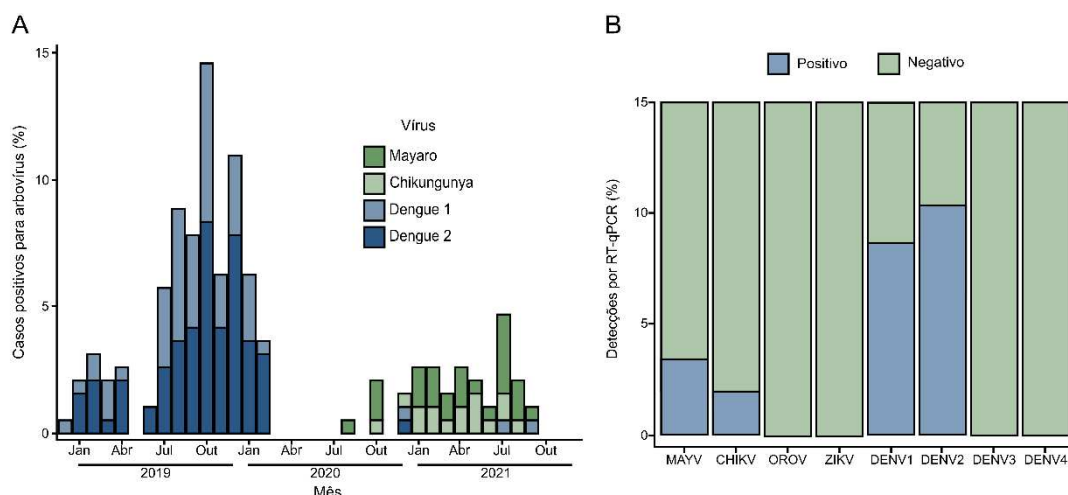
4. RESULTADOS

4.1. Detecção de arbovírus

Para investigar a circulação ativa de MAYV e de outros vírus endêmicos da região, os RNAs de 822 amostras de pacientes com síndrome febril aguda foram submetidos a ensaios de PCR em tempo real para detecção de MAYV, CHIKV, OROV, ZIKV e DENV1-4. Das 822 amostras testadas, 23,8% (196/822) apresentaram resultado positivo para pelo menos um arbovírus (**Figura 8B**). O RNA do MAYV foi detectado em 3,4% (28/822) dos pacientes, o CHIKV em 2% (16/822) das amostras, e o vírus da dengue em 18,5% (152/822) dos pacientes, sendo identificados 7,7% (63/822) de DENV1 e 10,8% (89/822) de DENV2 com co-deteções entre os sorotipos 1 e 2 do DENV ocorrendo em 1% (7/822) dos casos.

Os períodos de maior prevalência dos casos de MAYV, 67,9% (19/28) e CHIKV, 81,3% (13/16), foram entre janeiro e julho de 2021. Enquanto os casos de DENV1, 46% (29/63), ocorreram entre agosto e outubro de 2019 e os DENV2, 43,8% (39/89), ocorreram entre outubro e dezembro de 2019 (**Figura 8A**).

Figura 8. Distribuição percentual de detecções de arbovírus por RT-qPCR em Roraima entre 2018 e 2021. A. Percentual de casos positivos por PCR em relação ao total de casos febris testados para arbovírus (MAYV, CHIKV, DENV-1 e DENV-2) por mês em Roraima entre 2018 e 2021. **B.** Porcentagem de detecção de arbovírus (MAYV, CHIKV, ZIKV, OROV e DENV 1-4) por RT-qPCR em Roraima entre 2018 e 2021.



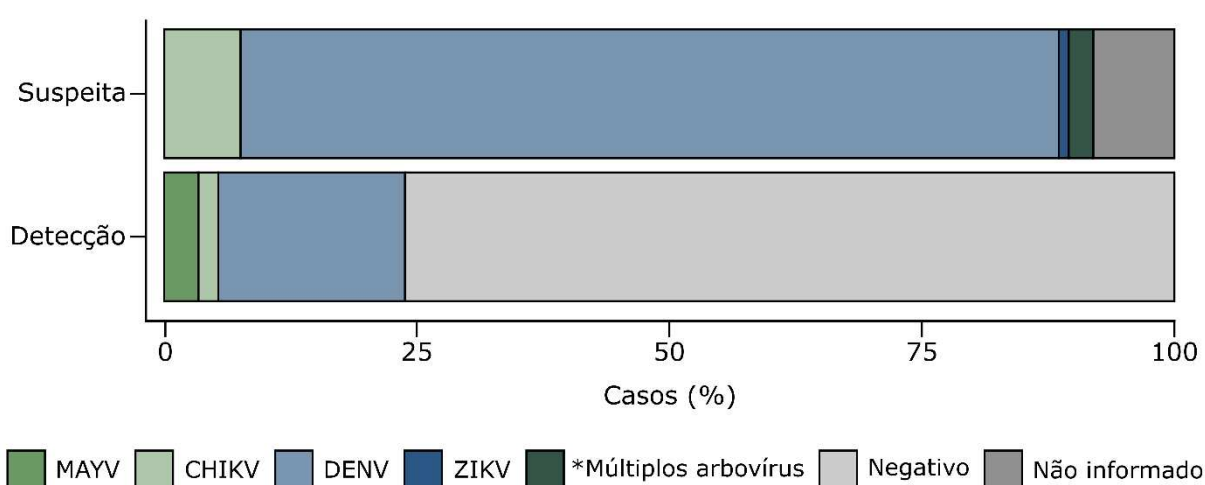
Legenda: MAYV: vírus Mayaro, CHIKV: vírus Chikungunya, ZIKV: vírus Zika, DENV1: sorotipo 1 do vírus Dengue e DENV2: sorotipo 2 do vírus Dengue, DENV3: sorotipo 3 do vírus Dengue e DENV4: sorotipo 4 do vírus Dengue.

Em relação à confirmação das suspeitas clínicas feitas nas unidades de saúde com base na sintomatologia, 85,9% (706/822) das notificações permaneceram

sem diagnóstico definido. Entre as 14,1% (116/822) das amostras que apresentaram detecção compatível com o diagnóstico sugerido, todas foram positivas para DENV (**Figura 9**). Nenhuma das amostras notificadas como suspeitas para CHIKV, ZIKV ou coinfeções entre esses vírus e DENV tiveram o diagnóstico confirmado. Além disso, 3,4% (28/822) das amostras, que não apresentavam suspeita clínica inicial, confirmaram a presença de RNA de MAYV e DENV.

Figura 9. Distribuição percentual da suspeita clínica e das detecções por RT-qPCR.

Comparativo entre suspeita clínica com as detecções por RT-qPCR nas amostras coletadas de pacientes com síndrome febril aguda por mês entre 2018 e 2021.

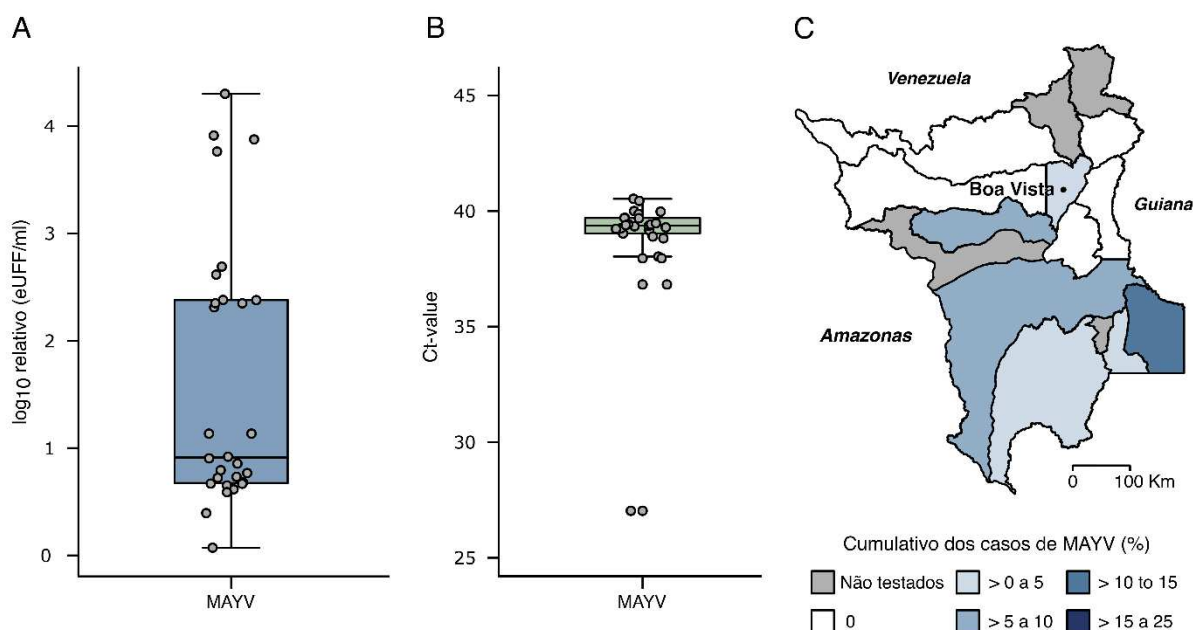


Legenda: MAYV: vírus Mayaro, CHIKV: vírus Chikungunya, ZIKV: vírus Zika, DENV: vírus Dengue. *Múltiplos arbovírus: suspeita diagnóstica de coinfeção entre CHIKV+DENV, CHIKV+ZIKV e CHIKV+ZIKV+DENV.

4.2. Epidemiologia do vírus Mayaro

O RNA do MAYV foi detectado nas amostras por RT-qPCR em 3,4% (28/822) das amostras testadas, com carga viral variando de $1,1 \times 10^0$ a $4,2 \times 10^4$ eUFF/ml (mediana da carga viral de $8,31 \times 10^0$ eUFF/ml) (**Figura 10A**) e Ct entre 27,0 e 40,5 (mediana de Ct de 39,3) (**Figura 10B**). O período de maior prevalência dos casos, 67,8% (19/28), ocorreu entre janeiro e julho de 2021 (**Figura 8A**). A maioria dos casos, 53,6% (15/28), foi registrada em pacientes de Boa Vista, seguida por Rorainópolis com 21,4% (6/28) (**Figura 10C**). Não foram detectadas amostras positivas nos municípios de Amajari, Alto Alegre, Bonfim, Cantá, Mucajaí e Normandia. Amostras de Iracema, Pacaraima, São Luiz e Uiramutã não foram testadas. Além disso, dois pacientes positivos não tinham informações sobre o município de residência.

Figura 10. Distribuição da carga viral, valores de Ct e localização dos casos de MAYV em Roraima entre 2018 e 2021. **A.** Distribuição da carga viral do MAYV, expressa em log₁₀ (eUFF/ml), obtida por RT-qPCR. **B.** Distribuição dos valores de Ct obtidos por RT-qPCR das amostras positivas para MAYV. **C.** Mapa das porcentagens acumuladas de casos positivos de MAYV por município de Roraima entre 2018 e 2021. Amajari (0%, 0/3), Alto Alegre (0%, 0/4), Boa Vista (3,9%, 15/384), Bonfim (0%, 0/40), Cantá (0%, 0/40), Caracaraí (8,7%, 2/23), Caroebe (13%, 1/8), Mucajaí (8%, 1/13), Normandia (0%, 0/5), Rorainópolis (3,5%, 6/172) e São João da Baliza (1,4%, 1/74). Não foram testadas amostras de Iracema, Pacaraima, São Luiz e Uiramutã. Em adição, 92 pacientes não tinham informação sobre o município de residência.



Legenda: Ct: Valor de limiar de ciclo “Cycle threshold value”. eUFF/ml: equivalente de unidades formadoras de foco por ml (*Focus-Forming Units*).

Entre os pacientes positivos 57,1% (16/28) foram do sexo masculino, com uma razão homem/mulher de 1:5. Uma ficha não continha informações de gênero. A mediana de idade foi de 31 anos (intervalo interquartil: 26 e 43). 75% (21/28) dos pacientes se autodeclararam pardos, 10,7% (3/28) brancos e 17,9% (5/28) não declararam raça/cor. A mediana do tempo entre o início dos sintomas e a coleta das amostras foi de 3 dias (intervalo interquartil: 1 e 4).

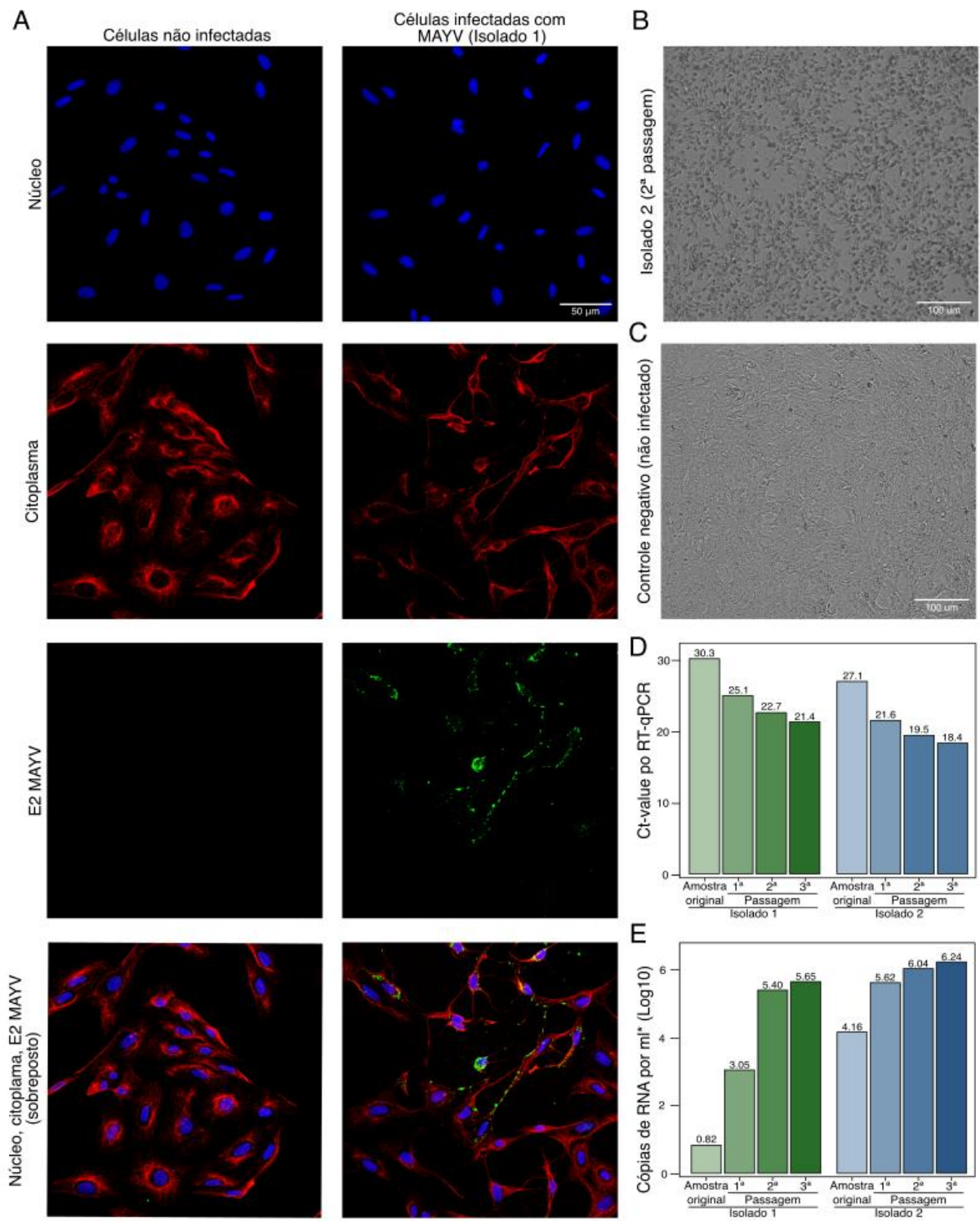
Febre e mialgia foram os sintomas mais relatados, presentes em 82,1% (23/28) dos casos de MAYV. Sintomas clássicos de febre Mayaro, como artralgia (21,4%, 6/28) e erupção cutânea (10,7%, 3/28), foram menos comuns. Em adição, entre os casos três pacientes (10,7%) eram pescadores que relataram contato direto com o ambiente silvestre. Outros sintomas relatados foram, cefaleia (78,6%, 22/28), dor nas costas (67,9%, 19/28), dor retro orbital (57,1%, 16/28), náuseas (57,1%, 16/28), vômitos

(39,3%, 11/28), artrite (17,9%, 5/28), artralgia (21,4%, 6/28), conjuntivite (3,6%, 1/28) petéquias (10,7%, 3/28) com 3,6% (1/28) testando positivo para a prova do laço.

4.2.1. Isolamento MAYV

Nove amostras positivas para MAYV por RT-qPCR, com valores de Ct $\leq 39,0$, foram submetidas ao protocolo de isolamento viral em células Vero CCL-81. Observamos efeitos citopáticos (CPE) cerca de 30 horas após a inoculação em duas amostras (**Figura 11B**). Realizamos 3 passagens cegas e confirmamos o isolamento viral de 2 linhagens de MAYV por RT-qPCR, detectando RNA viral no sobrenadante das passagens celulares que apresentavam CPE. As análises mostraram uma redução nos valores de Ct nos dois isolados, com uma queda de mais de 8 ciclos entre a amostra original e a terceira passagem (isolado #1, 30,3 para 21,4) (isolado #2: 27,1 para 18,4), representando aumento da carga viral entre as passagens (**Figura 11D**). Esse aumento foi confirmado pela elevação da carga viral de $0,8 \times 10^1$ para $5,7 \times 10^5$ eFFU/ml no isolado #1 e de $4,2 \times 10^4$ para $6,3 \times 10^6$ eFFU/ml no isolado #2 (**Figura 11E**). Além disso, para confirmar a presença de MAYV nos isolados, realizamos uma reação de imunofluorescência com células Vero infectadas com ambos isolados, usando um anticorpo produzido contra a proteína 2 do envelope do vírus (**Figura 11A**).

Figura 11. Caracterização dos isolados do MAYV em células Vero CCL-81. **A.** As imagens mostram a coloração de células Vero CCL-81 não infectadas e de células Vero CCL81 inoculadas com o isolado de MAYV #1 do paciente RR-407. As células foram coradas com anticorpos contra vimentina para visualização do citoplasma (fluorescência vermelha, linha 2) e a proteína 2 do envelope do MAYV (fluorescência verde, linha 3). Os núcleos foram marcados com corante Hoechst (fluorescência azul, linha 1). As lâminas foram analisadas por microscopia confocal, e as imagens foram mescladas com o ImageJ (mesclagem, linha 4). Isolados do vírus Mayaro em células de cultura obtidos a partir de amostras de soro de pacientes febris do município de Boa Vista em 2020 e 2021, Estado de Roraima, Brasil. Os isolados de MAYV foram obtidos do paciente RR-424 (isolado #1) e RR-58 (isolado #2). **B.** Células Vero CCL-81 com efeito citopático causado pela infecção por MAYV, 30 horas após a infecção. **C.** Células Vero CCL-81 não infectadas (controle negativo). **D.** Valores de Ct obtidos por RT-qPCR a partir dos isolados de MAYV e das amostras originais. **E.** Estimativa de cópias de RNA do MAYV por ml obtidas por RT-qPCR a partir dos isolados de MAYV e das amostras originais.

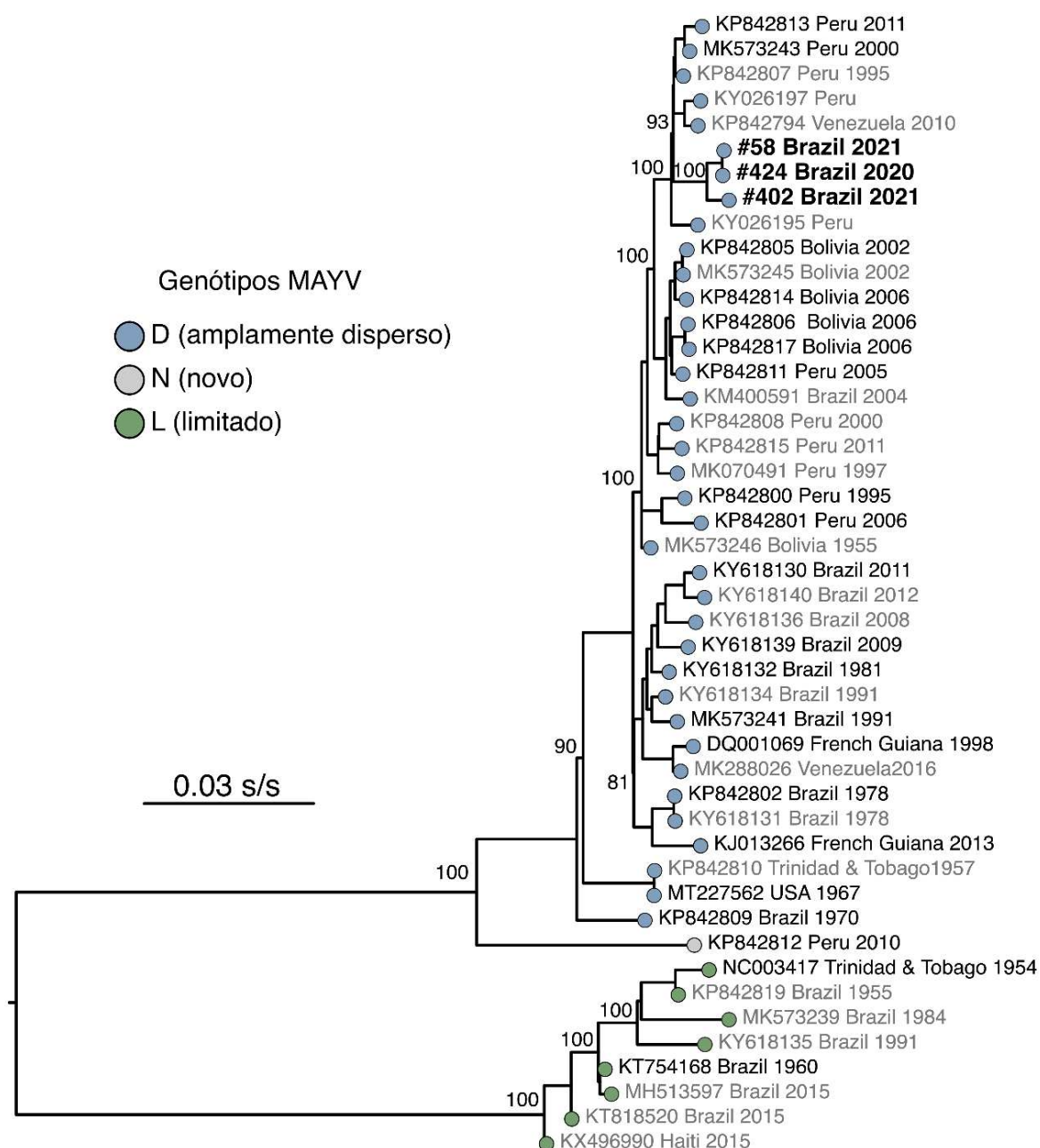


Legenda: MAYV, vírus Mayaro. E2, Proteína estrutural 2. Ct-Value, Valor de limiar de ciclo “cycle threshold value”.

4.2.2. Sequenciamento MAYV

Utilizamos o sequenciamento por nanopore para gerar sequências codificantes de quase a totalidade do genoma de três amostras de MAYV (o produto dos dois isolados e o produto feito diretamente da amostra clínica do paciente RR-407). Os genomas obtidos de MAYV tiveram uma cobertura superior a 90%, com uma profundidade mínima superior a 20 vezes por nucleotídeo. As sequências foram submetidas ao GenBank (números de acesso PP339762–PP339764). A análise filogenética de máxima verossimilhança revelou que as cepas de MAYV circulantes em Roraima em 2020 e 2021 pertencem ao genótipo D, amplamente disperso (**Figura 12**). Não encontramos evidências de recombinação nas cepas de MAYV de Roraima. As novas cepas compartilharam 98,6% a 98,9% de identidade de sequência nucleotídica com outras cepas do genótipo D. Além disso, essas novas cepas formaram um clado monofilético distinto e altamente suportado (suporte bootstrap de 100%) agrupando-se com cepas coletadas no Peru e na Venezuela entre 1995 e 2010. O pequeno número de sequências de genomas completos de MAYV disponíveis nos bancos de dados impediram que análises filogeográficas robustas fossem realizadas nesse estudo.

Figura 12. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do vírus MAYV em Roraima entre 2018 e 2021. A filogenia foi enraizada no ponto médio para maior clareza na apresentação. O texto em **negrito** indica os 3 novos genomas do vírus Mayaro. Os valores de *bootstrap*, baseados em 1.000 replicações, são apresentados nos nós principais. A barra de escala indica a distância evolutiva em substituições por local de nucleotídeo. Legenda: 424 Brazil 2020 (isolado #1), 58 Brazil 2021 (isolado #2).

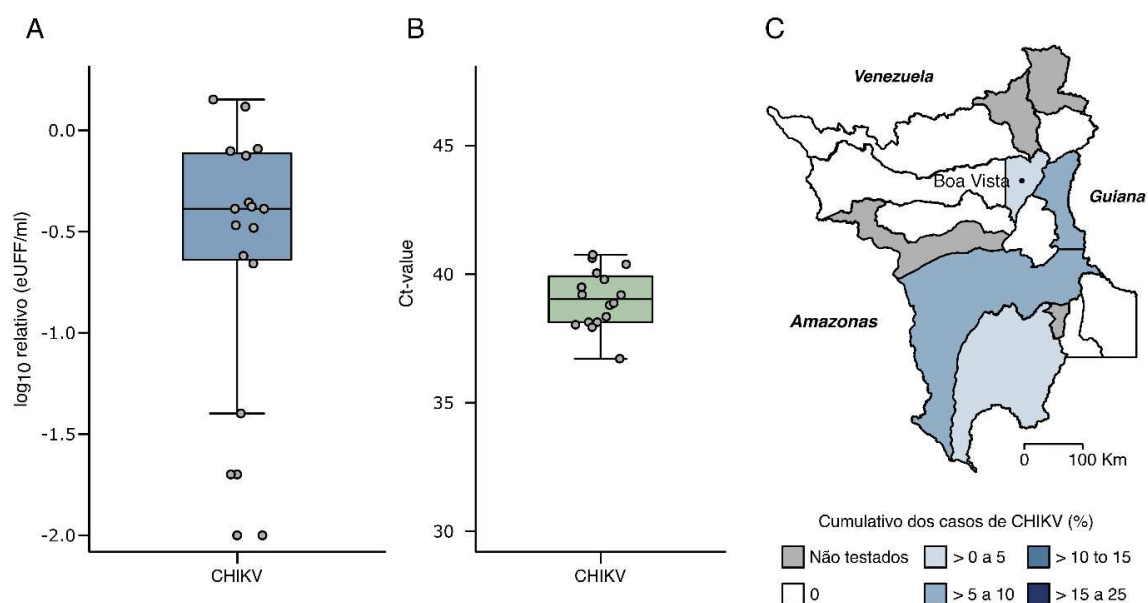


4.3. Epidemiologia do CHIKV

O RNA do CHIKV foi detectado em 2% (16/822) das amostras analisadas, com carga viral variando de 1×10^{-2} a $1,42 \times 10^0$ eUFF/ml (mediana da carga viral de $4,1 \times 10^{-1}$ eUFF/ml) (**Figura 13A**) e valores de Ct entre 36,7 e 40,7 (mediana de Ct de 39,0) (**Figura 13B**). A maioria dos casos 81,3% (13/16) ocorreu no entre janeiro e julho de 2021, coincidindo com o pico de casos de MAYV no estado (**Figura 8A**). O município de Rorainópolis concentrou 50% (8/16), seguido por Boa Vista com 25,0% (4/16) (**Figura 13C**). Não foram detectadas amostras positivas nos municípios de Amajari, Alto Alegre, Cantá, Caroebe, Mucajaí, Normandia e São João da Baliza. Entre as amostras positivas, 56,3% (9/16) foram mulheres, com uma razão homem/mulher foi de 0,8. A mediana de idade foi de 29 anos (intervalo interquartil, 27 e 42,5). A mediana de tempo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra foi de 3 dias (interquartil 1,75 e 3,25). A maioria dos pacientes 75,0% (12/16) se autodeclarou parda, seguidos por brancos e pretos representando 6,3% (1/16) cada. Dois pacientes não informaram sua raça/cor.

Os sintomas mais relatados foram a febre e cefaleia, presentes em 87,5% (14/16) dos casos, seguidos de mialgia em 75% (12/16) e dor nas costas em 68,75% (11/16), outros sintomas relatados foram, dor retro orbital (37,5%, 6/16), náuseas (31,3%, 5/16), vômitos (18,8%, 3/16), exantema (6,3%, 1/16), artrite (31,3%, 5/16), artralgia (12,5%, 2/16), conjuntivite (12,5%, 2/16) petéquias (12,5%, 2/16), leucopenia (6,3%, 1/16).

Figura 13. Distribuição da carga viral, valores de Ct e localização dos casos de CHIKV em Roraima entre 2018 e 2021. **A.** Distribuição da carga viral do CHIKV, expressa em log₁₀ (eUFF/ml), obtida por RT-qPCR. **B.** Distribuição dos valores de Ct obtidos por RT-qPCR das amostras positivas para CHIKV. **C.** Mapa das porcentagens acumuladas de casos positivos de CHIKV por município de Roraima entre 2018 e 2021. Amajari (0%, 0/3), Alto Alegre (0%, 0/4), Boa Vista (1%, 4/384), Bonfim (5%, 2/40), Cantá (0%, 0/40), Caracaraí (9%, 2/23), Caroebe (0%, 0/8), Mucajaí (0%, 0/13), Normandia (0%, 0/5), Rorainópolis (5%, 8/172) e São João da Baliza (0%, 0/74). Não foram testadas amostras de Iracema, Pacaraima, São Luiz e Uiramutã. Em adição, 92 pacientes não tinham informação sobre o município de residência.



Legenda: CHIKV: vírus Chikungunya, Ct: Valor de limiar de ciclo “*Cycle threshold value*”. eUFF/ml: equivalente de unidades formadoras de foco por ml (*Focus-Forming Units*).

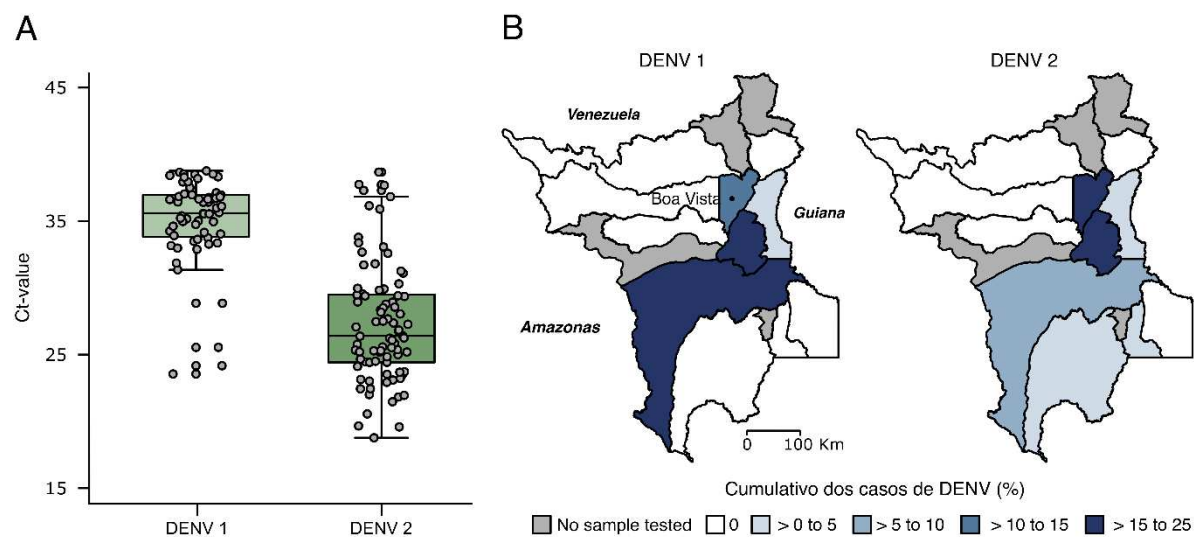
4.4. Epidemiologia do vírus Dengue

Investigamos a prevalência dos quatro sorotipos do vírus em amostras de pacientes com síndrome febril em Roraima. Identificamos uma incidência de 7,7% (63/822) para RNA do sorotipo 1 do DENV (DENV-1) nas amostras testadas, com valores de Ct variando entre 19,7 e 38,8 (mediana de Ct de 35,6) (**Figura 14 A**). O período de maior incidência dos casos, 46% (29/63), ocorreu entre agosto e outubro de 2019 (**Figura 8A**). A maioria dos casos, 79,4% (50/63), foi registrada em Boa Vista, seguida por Bonfim com 11,1% (7/63) (**Figura 8B**). Entre os pacientes positivos, 52,4% (33/63) eram homens, com uma razão homem/mulher de 1,2. A mediana de idade foi de 24,6 anos (intervalo interquartil, 15 e 34). Em relação à raça/cor, 73% (46/63) dos pacientes se autodeclararam pardos, 6,3% (4/63) brancos, 4,8% (3/63) pretos e 4,8% (3/63) indígenas, enquanto 11,1% (7/63) não responderam. A mediana do tempo entre

o início dos sintomas e a coleta da amostra foi de 2 dias (interquartil 1 e 3). Os sintomas mais frequentemente relatados foram febre, presente em 90,5% (57/63), cefaleia em 84,1% (53/63) e mialgia 76,2% (48/63).

A incidência do sorotipo 2 do DENV (DENV-2) foi de 10,8% (89/822), com valores de Ct entre 18,9 e 38,6 (mediana de 26,5) (**Figura 14A**). O pico de casos 45,8% (39/89) foi registrado entre outubro e dezembro de 2019 (**Figura 8A**). A maioria dos casos 75,3% (67/89) ocorreu em Boa Vista (**Figura 14B**). Homens representaram 49,4% (44/89), com uma razão homem/mulher de 1,1. A mediana de idade foi de 31 anos (intervalo interquartil, 19 e 41). O tempo mediano intervalo entre o início dos sintomas e a coleta foi de 2 dias (intervalo interquartil, 1 a 3). Em relação à raça/cor, 68,5% (61/89) dos pacientes se autodeclarou pardo, 6,7% (6/89) branca, 4,5% (4/89) indígena e 1,1% (1/89) pretos, enquanto 19,1% (17/89) informaram raça/cor. Os sintomas mais frequentes foram febre, presente em 85,4% (76/89) dos casos, seguida por cefaleia e mialgia, ambos com 79,8% (71/89).

Figura 14. Distribuição dos valores de Ct e localização dos casos de DENV em Roraima entre 2018 e 2021. **A.** Distribuição dos valores de Ct obtidos por RT-qPCR das amostras positivas para DENV1 e DENV2. **B.** Mapa das porcentagens acumuladas de casos positivos de DENV1 e DENV2 por município de Roraima entre 2018 e 2021. Frequência de casos de DENV-1 por município: Amajari (0%, 0/3), Alto Alegre (0%, 0/4), Boa Vista (13%, 50/384), Bonfim (5%, 2/40), Cantá (25%, 1/4), Caracaraí (17,4%, 4/23), Caroebe (0%, 0/8), Mucajaí (0%, 0/13), Normandia (0%, 0/5), Rorainópolis (0%, 0/172) e São João da Baliza (0%, 0/74). Frequência de casos de DENV-2 por município: Amajari (0%, 0/3), Alto Alegre (0%, 0/4), Boa Vista (18,2%, 70/384), Bonfim (5%, 2/40), Cantá (25%, 1/4), Caracaraí (8,7%, 2/23), Caroebe (0%, 0/8), Mucajaí (0%, 0/13), Normandia (0%, 0/5), Rorainópolis (3,5%, 6/172) e São João da Baliza (1,3%, 1/74). Não foram testadas amostras de Iracema, Pacaraima, São Luiz e Uiramutã. Em adição, 92 pacientes não tinham informação sobre o município de residência. Incluindo 4 positivos para DENV-1 e 12 positivos para DENV-2.



Legenda: DENV: vírus Dengue, Ct: Valor de limiar de ciclo "*Cycle threshold value*".

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos a circulação ativa do MAYV em humanos, ocorrendo simultaneamente a uma epidemia de CHIKV e DENV em Roraima, entre 2018 e 2021. Identificamos que os casos de MAYV foram causados pelo genótipo D, amplamente disseminado pela América Central e do Sul. Nossas análises filogenéticas mostraram que as cepas de MAYV que circularam em Roraima, entre 2020 e 2021, se agrupam, com cepas identificadas no Peru e na Venezuela entre 1995 e 2010 (Auguste *et al.*, 2015; Halsey *et al.*, 2013). Esses dados sugerem que o genótipo D permanece em circulação na região amazônica há mais de 60 anos. Ele também foi identificado em surtos recentes no Pará, Amazonas, assim como na Venezuela e Guiana Francesa, regiões próximas a Roraima. Entretanto, a escassez de sequências disponíveis em bancos de dados limita estudos sobre a disseminação e evolução do vírus, dificultando uma compreensão mais detalhada de sua circulação regional.

No Brasil, o diagnóstico de MAYV em laboratórios públicos de referência não é realizado na rotina, sendo feito apenas mediante solicitação médica, mesmo em regiões com registros recentes de circulação. As manifestações clínicas da febre de Mayaro são semelhantes às de outras arboviroses, como a dengue, e chikungunya, o que dificulta um diagnóstico clínico diferencial. Além disso, apenas 21,4% dos pacientes positivos relataram artralgia, e 10,7% apresentaram erupções cutâneas, sintomas clássicos da infecção. Esses achados indicam que o diagnóstico laboratorial deve ser considerado em pacientes com síndromes febris, mesmo na ausência de sintomas clássicos da febre por Mayaro.

Historicamente, as infecções por MAYV estão associadas a atividades ocupacionais ou recreativas em áreas florestais (Forshey *et al.*, 2010; Hoch *et al.*, 1981). Observamos que a maioria dos casos ocorreu em adultos jovens, predominantemente homens, incluindo três pescadores que relataram exposição direta a áreas de mata. Profissionais que atuam nesses ambientes, como mineradores, extrativistas de madeira e pescadores podem atuar como ponte para a introdução do MAYV em áreas urbanas, especialmente em cenários de desmatamento, que favorecem a exposição humana a vetores (Souza, de e Weaver, 2024). O desmatamento, por sua vez, é uma modificação ambiental que amplia a exposição humana a vetores antes restritos a áreas florestais, aumentando o risco de transmissão do MAYV e de outros arbovírus (Forshey *et al.*, 2010; Fouque e Reeder, 2019; Weaver e Barrett, 2004). Estudos apontam que mosquitos urbanos, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, são competentes para a transmissão do MAYV em condições laboratoriais, representando uma ameaça significativa à saúde pública (Fernandez *et al.*, 2023; Weaver, 2013). A ampla

distribuição desses mosquitos em regiões tropicais agrava ainda mais o risco, especialmente diante da ausência de vacina ou tratamentos específicos para o MAYV.

Além do MAYV, identificamos a circulação de CHIKV e DENV em Roraima. A circulação do CHIKV no Brasil é relativamente recente, com registros da introdução de duas linhagens na região amazônica, em momentos distintos na última década (Souza, de *et al.*, 2024). A primeira, da linhagem Asiática, e a segunda, da linhagem *East-Central-South-Africa* (ECSA), que se estabeleceu no estado e foi responsável pela epidemia ocorrida entre 2014 e 2018 (Naveca *et al.*, 2018). Também observamos que o pico de casos de chikungunya coincidiu com o período de maior detecção do MAYV. A presença simultânea desses dois alfavírus, ambos pertencentes ao Complexo da Floresta Semliki e compartilhando sítios antigênicos, levanta questões sobre a efetividade de uma possível proteção cruzada entre esses vírus (Fumagalli *et al.*, 2021). Além disso, o risco de reatividade cruzada em testes sorológicos, e a semelhança entre os sintomas, pode levar a diagnósticos incorretos.

Nossos achados demonstram uma alta incidência de DENV, com detecção da circulação dos sorotipos 1 e 2. Historicamente, Roraima tem desempenhado um papel crucial na introdução e manutenção de novos genótipos de DENV e outros arbovírus provenientes do Caribe, atuando como uma rota de entrada para novos vírus no Brasil (Gubler, 2002). Esse fenômeno pode estar relacionado à mobilidade humana, à presença constante de vetores e à ampla gama de hospedeiros susceptíveis. Esse papel histórico é evidenciado pelo fato de Roraima ter sido o primeiro estado brasileiro a confirmar laboratorialmente uma epidemia de dengue, em 1981, causada pelos sorotipos 1 e 4, que rapidamente se disseminaram para outros estados brasileiros (Acosta *et al.*, 2011; Osanai *et al.*, 1983). Atualmente, o estado é classificado pelo ministério da saúde como hiperendêmico para dengue devido às epidemias recorrentes e à circulação simultânea dos quatro sorotipos, com substituições de genótipos ao longo do tempo (Acosta *et al.*, 2012, 2014; Siqueira, T. *et al.*, 2009).

Em regiões endêmicas para DENV, critérios clínico-epidemiológicos são amplamente utilizados durante a sobrecarga nos serviços de saúde. Contudo, nessas áreas, doenças febris inespecíficas podem circular de forma silenciosa, muitas vezes sendo erroneamente diagnosticadas como dengue com base apenas nos sintomas clínicos. Em nossas análises de RT-qPCR realizadas neste estudo confirmaram a baixa correspondência entre suspeitas clínicas e resultados laboratoriais, e reforçando a necessidade de diagnóstico laboratorial. Nesse estudo descrevemos a circulação simultânea de quatro arboviroses, sendo a maioria dos casos inicialmente notificados aos órgãos de saúde como suspeitos para dengue, sem a solicitação de investigação adicional para outras arboviroses. Casos semelhantes são descritos na literatura, onde

pacientes posteriormente confirmados como positivos para MAYV, SLEV (vírus da encefalite de Saint Louis) e OROV haviam recebido diagnósticos clínicos preliminares de DENV (Mondini *et al.*, 2007; Mourão *et al.*, 2009, 2012; Vieira *et al.*, 2015).

Nossos dados destacam a necessidade de fortalecer a vigilância epidemiológica e laboratorial para arboviroses em áreas endêmicas. Essa abordagem é essencial para identificar os vírus em circulação, mesmo em pacientes sem sintomas clássicos associados às infecções. Além de melhorar os diagnósticos, a vigilância robusta facilita a implementação de estratégias eficazes para a contenção de possíveis epidemias.

6. LIMITAÇÃO DO ESTUDO

Nosso estudo teve um enfoque em infecções ativas por MAYV, usando uma abordagem molecular, porém estudos sorológicos adicionais são necessários para determinar a fração da população previamente infectada. Estudos sorológicos podem esclarecer o impacto potencial da proteção cruzada entre CHIKV e MAYV na região amazônica. Não foi possível determinar se as infecções ocorreram em ambientes urbanos ou florestais, e não há informações sobre doenças crônicas em pacientes infectados por MAYV. Além disso, a alta porcentagem de amostras negativas (76,2%) para as arboviroses testadas mostra que a abordagem metagenômica pode ser útil em estudos futuros para determinar o cenário de agentes etiológicos ligados à doença febril na região da tríplice fronteira (Brasil, Guiana e Venezuela).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo identificou a co-circulação ativa de MAYV, DENV e CHIKV em pacientes com doença febril em Roraima entre 2018 e 2021. Essas descobertas ressaltam a necessidade crítica de diagnóstico laboratorial contínuo para MAYV para determinar o seu fardo na Região Amazônica e sua possível circulação em ambientes urbanos.

8. REFERÊNCIAS

ACOSTA, P. O. A. *et al.* Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1979–1981, out. 2011.

ACOSTA, P. O. A. *et al.* Dengue in the northernmost part of Brazil from 1999 to 2011: characterization of circulating DENV strains. **Dengue Bulletin (WHO)**, v. 36, p. 50–63, 2012.

ACOSTA, P. O. A. *et al.* FALSE-NEGATIVE DENGUE CASES IN RORAIMA, BRAZIL: AN APPROACH REGARDING THE HIGH NUMBER OF NEGATIVE RESULTS BY NS1 AG KITS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 447–450, set. 2014.

ACOSTA-AMPUDIA, Y. *et al.* **Mayaro: an emerging viral threat?** **Emerging Microbes and Infections** Nature Publishing Group, , 1 dez. 2018.

ANDERSON, C. R. *et al.* Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, nov. 1957.

AUGUSTE, A. J. *et al.* Evolutionary and ecological characterization of mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742–1750, 1 set. 2015.

BALM, M. N. D. *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, set. 2012.

BASTA, P. C. Gold mining in the Amazon: the origin of the Yanomami health crisis. **Cadernos de Saude Publica**, v. 39, n. 12, 2023.

BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BONIFAY, T. *et al.* **Review on Main Arboviruses Circulating on French Guiana, An Ultra-Peripheral European Region in South America** **Viruses** MDPI, , 1 jun. 2023.

BURT, F. J. *et al.* **Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen** **The Lancet Infectious Diseases** Lancet Publishing Group, , 1 abr. 2017.

CAICEDO, E. Y. *et al.* The epidemiology of mayaro virus in the americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, 1 jun. 2021.

CALLAHAN, J. D. *et al.* Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4119–4124, 2001.

CAMPBELL, G. L. *et al.* West Nile virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 519–529, set. 2002.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016.

CASALS, J.; WHITMAN, L. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1004–1011, nov. 1957.

CAUSEY O.R.; MAROJA A.M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. **Am J Trop Med Hyg** ., v. 6, n. 6, p. 1017–23, nov. 1957.

CELONE, M. *et al.* A systematic review and meta-analysis of the potential non-human animal reservoirs and arthropod vectors of the Mayaro virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, 1 dez. 2021.

CLARO, I. M. *et al.* Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. **Wellcome Open Research**, v. 6, p. 241, 20 set. 2021.

COFFEY, L. L. *et al.* **Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: Implications for the emergence of disease** *Future Microbiology*, fev. 2013.

COSTER, W. DE *et al.* NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. **Bioinformatics**, v. 34, n. 15, p. 2666–2669, 1 ago. 2018.

DIAGNE, C. *et al.* High and rising economic costs of biological invasions worldwide. **Nature**, v. 592, n. 7855, p. 571–576, 22 abr. 2021.

DIAGNE, C. T. *et al.* **Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms** *Pathogens* MDPI AG, , 1 set. 2020.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saude Publica**, v. 51, 2017.

ECDC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Chikungunya worldwide overview: Situation update, December 2024**. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>>. Acesso em: 26 dez. 2024.

FERNANDEZ, D. *et al.* Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes to Infection by Mayaro Virus Strains. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 1, p. 115–122, 1 jul. 2023.

FORATO, J. *et al.* Molecular Epidemiology of Mayaro Virus among Febrile Patients, Roraima State, Brazil, 2018-2021. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 1013–1016, 1 maio 2024.

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, 2010.

FOUQUE, F.; REEDER, J. C. **Impact of past and on-going changes on climate and weather on vector-borne diseases transmission: A look at the evidence***Infectious Diseases of Poverty*BioMed Central Ltd., , 13 jun. 2019.

FRANKLINOS, L. H. V. *et al.* **The effect of global change on mosquito-borne disease***The Lancet Infectious Diseases*Lancet Publishing Group, , 1 set. 2019.

FREPPEL, W. *et al.* **Pathogenicity and virulence of chikungunya virus***Virulence*Taylor and Francis Ltd., , 2024.

FUMAGALLI, M. J. *et al.* Chikungunya Virus Exposure Partially Cross-Protects against Mayaro Virus Infection in Mice. **Journal of Virology**, v. 95, n. 23, 9 nov. 2021.

GRÄF, T. *et al.* Expansion of Oropouche virus in non-endemic Brazilian regions: analysis of genomic characterisation and ecological drivers. **The Lancet Infectious Diseases**, nov. 2024.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100–103, fev. 2002.

HALSEY, E. S. *et al.* Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1839–1842, nov. 2013.

HAYD, R. L. N. *et al.* Persistent chikungunya arthritis in Roraima, Brazil. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 9, p. 2781–2787, 13 set. 2020.

HAYD, R. L. N.; CALDART, R. V.; LOUZADA, J. Monitoramento e controle do *Aedes aegypti* no Estado de Roraima , Brasil : Uma breve revisão. v. 16, p. 52–58, 2021.

HOCH, A. L. *et al.* An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 689–698, maio 1981.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). **EPIDEMIA DO VÍRUS ZIKA E MICROCEFALIA NO BRASIL: EMERGÊNCIA, EVOLUÇÃO E ENFRENTAMENTO**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8282/1/td_2368.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2025.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4977–4983, 2005.

JONES, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 21 fev. 2008.

KALYAANAMOORTHY, S. *et al.* ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, 30 maio 2017.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.

KHAN, M. B. *et al.* **Dengue overview: An updated systemic review** *Journal of Infection and Public Health* Elsevier Ltd, , 1 out. 2023.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, maio 2007.

LEDNICKY, J. *et al.* Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 2000–2002, 1 nov. 2016.

LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P.; ROSA, A. P. A. T. DA. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 682–688, maio 1981.

LI, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, ago. 2009.

_____. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. **Bioinformatics**, v. 34, n. 18, p. 3094–3100, 15 set. 2018.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, set. 2014.

MARTIN, D. P. *et al.* RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, mar. 2015.

MESSINA, J. P. *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 1 set. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. [s.l.: s.n.].

MIRANDA, I. S.; ABSY, M. L. Fisionomia das savanas de Roraima, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 3, p. 423–423, set. 2000.

MLAKAR, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

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

MORDECAI, E. A. *et al.* Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 27 abr. 2017.

MOURÃO, M. P. G. *et al.* Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 2063–2064, dez. 2009.

MOURÃO, M. P. G. *et al.* Mayaro fever in the city of manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42–46, 1 jan. 2012.

NAVECA, F. G. *et al.* Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Roraima, Brazil. **Journal of Virology**, v. 86, n. 3, p. 1897–1898, 2012.

NAVECA, F. G. *et al.* Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2018.

_____. Human outbreaks of a novel reassortant Oropouche virus in the Brazilian Amazon region. **Nature Medicine**, v. 30, n. 12, p. 3509–3521, 18 dez. 2024.

NGUYEN, L. T. *et al.* IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 1 jan. 2015.

NJAU, E. P. *et al.* **African swine fever virus (ASFV): Biology, genomics and genotypes circulating in Sub-Saharan Africa** *Viruses* MDPI, , 1 nov. 2021.

NSOESIE, E. O. *et al.* Global distribution and environmental suitability for chikungunya virus, 1952 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 20, 19 maio 2016.

OSANAI, C. *et al.* Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53–4, fev. 1983.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Epidemiological Alert: Mayaro fever**. Washington, D.C.: [s.n.]. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51485/EpiUpdate1May2019_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 26 dez. 2024.

_____. **Zika**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika.html>>. Acesso em: 26 dez. 2024a.

_____. **Zika - Weekly report.** Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika-weekly-en/>. Acesso em: 26 dez. 2024b.

PLOWRIGHT, R. K. *et al.* **Pathways to zoonotic spillover** *Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 1 ago. 2017.

_____. **Land use-induced spillover: a call to action to safeguard environmental, animal, and human health** *The Lancet Planetary Health* Elsevier B.V., , 1 abr. 2021.

POWERS, A. M. *et al.* Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, nov. 2001.

_____. GENETIC RELATIONSHIPS AMONG MAYARO AND UNA VIRUSES SUGGEST DISTINCT PATTERNS OF TRANSMISSION. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461–469, set. 2006.

RIBAS, C. V. **La migración en Venezuela como dimensión de la crisis.** [s.l.: s.n.].

RORAIMA, S. DE S. DO E. DE. **Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima, 2017.** Boa Vista: [s.n.].

SAMINATHAN, M. *et al.* **An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India** *Veterinary Quarterly* Taylor and Francis Ltd., , 1 jan. 2020.

SANTOS, G. R. DOS *et al.* **The global burden of chikungunya virus and the potential benefit of vaccines,** 25 out. 2024. Disponível em: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.10.24.24315872>>

SCACHETTI, G. C. *et al.* Re-emergence of Oropouche virus between 2023 and 2024 in Brazil: an observational epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, out. 2024.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE RORAIMA. **Relatório Anual de Vigilância Epidemiológica de Roraima.** Boa Vista/RR: [s.n.].

SINHA, S. *et al.* **Dengue virus pathogenesis and host molecular machineries** *Journal of Biomedical Science* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2024.

SIQUEIRA, T. *et al.* **Epidemias de dengue no estado de Roraima de 1999 a 2009: sorotipos circulantes e formas graves da doença.** 61ª Reunião Anual da SBPC. **Anais...** Manaus: Resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC, jul. 2009 Disponível em:

<<https://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6360.htm>>. Acesso em: 1 jan. 2025

SIQUEIRA, T. C. S. *et al.* **EPIDEMIAS DE DENGUE NO ESTADO DE RORAIMA DE 1999 A 2009: SOROTIPOS CIRCULANTES E FORMAS GRAVES DA DOENÇA.** Boa Vista/RR: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6360.htm>>.

SOARES, S. R. *et al.* Prevalência das arboviroses urbanas em Roraima. **REVISTA DELOS**, v. 17, n. 61, p. e2529, 4 nov. 2024.

SOUZA LUNA, L. K. DE *et al.* Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 6, p. 1108–1111, 1 jun. 2017.

SOUZA, W. M. DE *et al.* **Chikungunya: a decade of burden in the Americas***The Lancet Regional Health - Americas*Elsevier Ltd, , 1 fev. 2024.

SOUZA, W. M. DE; WEAVER, S. C. **Effects of climate change and human activities on vector-borne diseases***Nature Reviews Microbiology*Nature Research, , 1 ago. 2024.

SUHRBIER, A. **Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions***Nature Reviews Rheumatology*Nature Publishing Group, , 1 out. 2019.

SUKHRALIA, S. *et al.* From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 1, p. 3–14, 28 jan. 2019.

TESH, R. B. *et al.* Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 67–73, jan. 1999.

THEILER, M.; SMITH, H. H. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 6, p. 787–800, 1 jun. 1937.

TIMONEY, P. Vesicular stomatitis. **Veterinary Record**, v. 179, n. 5, p. 119–120, 30 jul. 2016.

TINTO, B. *et al.* **Rift Valley fever in West Africa: A zoonotic disease with multiple socio-economic consequences***One Health*Elsevier B.V., , 1 dez. 2023.

U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **West Nile Virus: Historic Data (1999-2023).** Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/west-nile-virus/data-maps/historic-data.html>>. Acesso em: 26 dez. 2024a.

_____. **West Nile Virus: Current Year Data (2024)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/west-nile-virus/data-maps/current-year-data.html>>. Acesso em: 26 dez. 2024b.

VALENTINE, M. J.; MURDOCK, C. C.; KELLY, P. J. **Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates***Parasites and Vectors* BioMed Central Ltd., , 2 out. 2019.

VIEIRA, C. J. DA S. P. *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 12–16, 1 jul. 2015.

WAGGONER, J. J. *et al.* Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology**, v. 98, p. 1–4, 1 jan. 2018.

WANG, W. H. *et al.* **Emerging and re-emerging diseases***Pathogens* MDPI AG, , 1 jul. 2021.

WEAVER, S. C. *et al.* **Venezuelan Equine Encephalitis***Annual Review of Entomology*, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14651460/>>. Acesso em: 28 dez. 2024

_____. **Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention***Trends in Microbiology*, ago. 2013.

_____. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 69, p. 395–408, 29 jan. 2018.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. **Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease***Nature Reviews Microbiology*, out. 2004.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. **Present and future arboviral threats***Antiviral Research*, fev. 2010.

WEBER, W. C. *et al.* The Approved Live-Attenuated Chikungunya Virus Vaccine (IXCHIQ®) Elicits Cross-Neutralizing Antibody Breadth Extending to Multiple Arthritogenic Alphaviruses Similar to the Antibody Breadth Following Natural Infection. **Vaccines**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2024.

WHO, W. H. O. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19**, 11 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>>. Acesso em: 19 fev. 2025

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO position on the use of fractional doses – June 2017, addendum to vaccines and vaccination against yellow fever WHO: Position paper – June 2013**VaccineElsevier Ltd, , 13 out. 2017.

____. **Vector-borne diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 26 dez. 2024.

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. *Em*: HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. (Eds.). . **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**. 1. ed. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. v. 1062p. 1–10.

ZELLER, H.; BORTEL, W. VAN; SUDRE, B. **Chikungunya: Its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014**Journal of Infectious Diseases. **Anais...**Oxford University Press, 1 dez. 2016

9. ANEXOS

9.1. Artigo da dissertação

Molecular Epidemiology of Mayaro Virus among Febrile Patients, Roraima State, Brazil, 2018–2021

Julia Forato, Cássio A. Meira, Ingra M. Claro, Mariene R. Amorim, Gabriela F. de Souza, Stefanie P. Muraro, Daniel A. Toledo-Teixeira, Miguel F. Dias, Cátia A. R. Meneses, Rodrigo N. Angerami, Pritesh Lalwani, Scott C. Weaver, Ester C. Sabino, Nuno R. Faria, William M. de Souza,¹ Fabiana Granja,¹ José Luiz Proença-Modena¹

We detected Mayaro virus (MAYV) in 3.4% (28/822) of febrile patients tested during 2018–2021 from Roraima State, Brazil. We also isolated MAYV strains and confirmed that these cases were caused by genotype D. Improved surveillance is needed to better determine the burden of MAYV in the Amazon Region.

Mayaro virus (MAYV) is an endemic and neglected mosquito-borne alphavirus that causes acute and chronic debilitating arthritogenic disease in Latin America and the Caribbean (1). MAYV infection can cause fever, rash, and arthralgia that can persist for over a year in some patients (2). MAYV is transmitted in its enzootic cycle mainly by sylvatic *Haemagogus janthinomys* mosquitoes among nonhuman primates and other mammals, which can lead to spillover to humans (2). However, some experimental studies suggest that MAYV could establish a human-amplified cycle in urban environments when transmitted by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes, which

could lead to a larger public health threat (3,4). No specific antiviral drugs or vaccines are available to treat or prevent MAYV infection.

MAYV infections have been reported in Central and South America since the 1950s (1,2). However, reports of active circulation of MAYV in human populations remain scarce, even in MAYV-endemic areas. We conducted a molecular epidemiology study to investigate the active circulation of MAYV in patients with acute febrile illness during 2018–2021 from the Amazon Region in Roraima State, Brazil.

The Study

During December 2018–December 2021, we collected serum samples from 822 patients with acute febrile illness (up to 10 days from onset of symptoms) seeking care at primary health care units across 11 of the 15 municipalities of Roraima State, North Region, Brazil. We collected patient information, such as age, sex, occupation, sample collection data, date of symptom onset, and symptoms, from medical records. We conducted all procedures in accordance with ethics committee approval from the Federal University of Roraima (approval no. 2.881.239) and the University of Campinas (approval no. 5.625.875).

Next, we extracted RNA from all serum samples and performed real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR) to detect RNA of MAYV, chikungunya virus (CHIKV), Zika virus, dengue virus (DENV), and Oropouche virus. We also carried out viral isolation in African green monkey kidney cells (Vero CCL-81) with some positive samples. Then, we performed sequencing by using the nanopore approach (5) and conducted maximum-likelihood phylogenetic

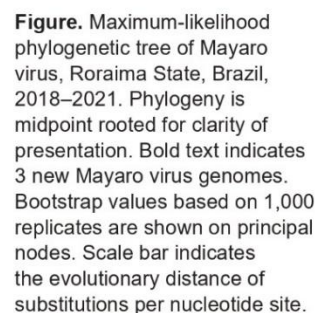
Author affiliations: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil (J. Forato, M.R. Amorim, D.A. Toledo-Teixeira, R.N. Angerami, F. Granja, J.L. Proença-Modena); Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima, Boa Vista, Brazil (C.A. Meira, C.A.R. Meneses); University of São Paulo, São Paulo (I.M. Claro, E.C. Sabino, N.R. Faria); Imperial College London, London, UK (I.M. Claro, N.R. Faria); University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA (W.M. de Souza); Global Virus Network, Baltimore, Maryland, USA (W.M. de Souza, S.C. Weaver); Federal University of Roraima, Boa Vista (M.F. Dias, F. Granja); Fiocruz Amazônia, Manaus, Brazil (P. Lalwani); University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA (S.C. Weaver); University of Oxford, Oxford, UK (N.R. Faria)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3005.231406>

¹These senior authors contributed equally to this article.

Of 822 patients tested by rRT-PCR, 190 (23.1%) were positive for ≥ 1 arbovirus (Appendix Figure 1). We detected MAYV RNA in 28 (3%) patients, including 15 (54%) patients from Boa Vista, the most populous municipality in Roraima State (Appendix Figure 2). Most (19 [68%]) MAYV cases occurred during January–July 2021. Among patients with rRT-PCR–confirmed MAYV, median age was 31 years (interquartile range 26–43 years), and the male-to-female ratio was 1:5. The most common signs and symptoms reported were fever and myalgia, both of which were reported in 23 (82%) MAYV cases. Arthralgia was reported in 6 (21%) and rash in 3 (11%) cases. The median time between symptom onset and sample collection interval was 3 days (interquartile range 1–4 days). Three (11%) of the MAYV cases were in fishermen who had direct contact with wildlife.

The maximum-likelihood phylogenetic analysis showed that the MAYV strains circulating in Roraima



State in 2021 belong to genotype D (widely dispersed) (Figure). We identified no evidence of recombination in MAYV strains from Roraima State. The novel MAYV strains shared 98.6%–98.9% nucleotide sequence identity with other genotype D strains. The new strains formed a distinct and highly supported monophyletic clade (bootstrap support 100%) and clustered with strains sampled in Peru and Venezuela during 1995–2010.

Finally, we also detected CHIKV RNA in 16 (2%) and DENV in 146 (17.8%) patients tested (Appendix Figures 1, 5). This number includes 63 patients with DENV serotype 1 and 89 patients with DENV serotype 2. Of those, we identified 6 (1%) cases with co-detection of DENV-1 and DENV-2. We detected most (13 [81%]) chikungunya cases in patients with febrile illness during January–July 2021, overlapping with the peak of detection for MAYV. Conversely, dengue cases were predominantly confirmed (110 [75.3%]) in patients with fever during July 2019–January 2020. All samples tested were negative for RNA of Zika virus, Oropouche viruses, and DENV serotypes 3 and 4.

Conclusions

This study reports the active MAYV circulation in humans during the concurrent chikungunya and dengue epidemic in Roraima State, Brazil. We found that the MAYV infection cases were caused by genotype D, suggesting that this widespread genotype continued to circulate in the Amazon Region for ≥ 60 years. In addition, this same genotype has been detected in outbreaks in Venezuela (6,7), which, like Guyana, shares borders with Brazil through Roraima State.

Arthralgia has been described as a major clinical characteristic of human MAYV infection (8). However, only 21% of MAYV-positive patients reported arthralgia in this study. Our data suggest that laboratory diagnosis of MAYV should be considered for patients with febrile illness in MAYV-endemic areas, even in the absence of clinical characteristics typically associated with MAYV infection. We also found that young adults and men account for most of the MAYV infection cases, probably because of occupational exposure (9). Persons who work in forest environments (e.g., in mining, logging, and fishing) could be a bridge to facilitate the eventual introduction and establishment of MAYV transmission in urban settings (7). Moreover, the implementation of augmented molecular and genomic surveillance in human and urban vector populations (i.e., *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes) will be critical to monitor the

potential establishment of MAYV in a human-amplified transmission cycle.

One limitation of our study is that we focused on active MAYV infections by using a molecular approach; however, further serologic studies are needed to determine the fraction of the population previously infected. Serologic studies can shed light on the potential effect of cross-protection between CHIKV and MAYV in the Amazon Region (10). Moreover, the higher percentage (76.9%) of samples negative for the arboviruses tested shows that the metagenomic approach could be useful in further studies to determine the landscape of etiologic agents linked with febrile illness in the triple border region (i.e., Brazil, Guyana, and Venezuela). Further, we were unable to determine whether MAYV infections occurred in urban or forest settings, and we have no follow-up information on MAYV cases.

In conclusion, our study identified the active co-circulation of MAYV, DENV, and CHIKV in patients with febrile illness in Roraima State, Brazil. These findings underscore the critical need for continuous laboratory diagnosis for MAYV to determine the prevalence of MAYV in the Amazon Region and the potential changes associated with urbanization.

Acknowledgments

We thank Clarice Arns for her technical support and Rafael Elias Marques for providing the Mayaro and dengue virus isolates.

This study was supported by grants from São Paulo Research Foundation (grant nos. 2016/00194-8, 2020/04558-0, and 2022/10442-0). J.F. was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel scholarships (grant no. 309971/2023-3). W.M.d.S. was supported by a Global Virus Network fellowship, Burroughs Wellcome Fund (grant no. 1022448), and Wellcome Trust–Digital Technology Development award (climate sensitive infectious disease modelling, under grant no. 226075/Z/22/Z). I.M.C. was supported by São Paulo Research Foundation (grant no. 2018/17176-8) and the Bill and Melinda Gates Foundation (grant no. INV-034540). S.C.W. was supported by the National Institutes of Health (grant nos. AI12094, U01AI151801, and AI121452). J.L.P.-M. is supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant no. 305628/2020-8). This project was supported by the Medical Research Council and São Paulo Research Foundation Centre for Arbovirus Discovery, Diagnosis, Genomics and Epidemiology partnership award (grant nos. MR/S0195/1 and FAPESP 2018/14389-0).

DISPATCHES

About the Author

Ms. Forato is a master's candidate at the Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology at the University of Campinas, São Paulo, Brazil. Her research interests include epidemiologic surveillance of emerging viruses with a focus on arboviruses.

References

1. Caicedo EY, Charniga K, Rueda A, Dorigatti I, Mendez Y, Hamlet A, et al. The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: a systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15:e0009418. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009418>
2. Hoch AL, Peterson NE, LeDuc JW, Pinheiro FP. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30:689–98. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.689>
3. Fernández D, Yun R, Zhou J, Parise PL, Mosso-González C, Villasante-Tezanos A, et al. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes to infection by Mayaro virus strains. *Am J Trop Med Hyg*. 2023;109:115–22. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0777>
4. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol*. 2013;21:360–3. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>
5. Claro IM, Ramundo MS, Coletti TM, da Silva CAM, Valença IN, Candido DS, et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Res*. 2023;6:241. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.2>
6. Auguste AJ, Liria J, Forrester NL, Giambalvo D, Moncada M, Long KC, et al. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1742–50. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141660>
7. Guégan JF, Ayoub A, Cappelle J, De Thoisy B. Forests and emerging infectious diseases: unleashing the beast within [cited 2023 Aug 17]. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/ab8dd7>
8. Halsey ES, Siles C, Guevara C, Vilcarromero S, Johnston EJ, Ramal C, et al. Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010–2013. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1839–42. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130777>
9. Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, et al. NMRCD Febrile Surveillance Working Group. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South America, 2000–2007. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e787. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000787>
10. Fumagalli MJ, de Souza WM, de Castro-Jorge LA, de Carvalho RVH, Castro ÍA, de Almeida LGN, et al. Chikungunya virus exposure partially cross-protects against Mayaro virus infection in mice. *J Virol*. 2021;95:e0112221. <https://doi.org/10.1128/JVI.01122-21>

Address for correspondence: Julia Forato, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, No. 255, 13.083-862, Campinas, São Paulo, Brazil; email: foratojulia@gmail.com

EID Podcast *Angiostrongylus cantonensis* Infection in Brown Rats (*Rattus norvegicus*), Atlanta, Georgia, USA, 2019–2022



Rat lungworm (*Angiostrongylus cantonensis*), causes eosinophilic meningoencephalitis in people and other accidental mammal hosts. Tissue samples were collected from wild brown rats found dead during 2019–2022 on the grounds of a zoological facility in Atlanta, Georgia, and were confirmed to be infected with *A. cantonensis*. This discovery suggests that this zoonotic parasite was introduced to and has become established in a new area of the southeastern United States.

In this EID podcast, Dr. Guilherme Verocai, a clinical assistant professor at Texas A&M University, discusses rat lungworm infection in brown rats in Atlanta, Georgia.

Visit our website to listen:
<https://bit.ly/3RadwLC>

**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES®**

9.2. Artigos publicados no período

1. **Forato, Julia**, Cássio A. Meira, Ingra M. Claro, Mariene R. Amorim, Gabriela F. de Souza, Stefanie P. Muraro, Daniel A. Toledo-Teixeira, Miguel F. Dias, Cátia A. R. Meneses, Rodrigo N. Angerami, Pritesh Lalwani, Scott C. Weaver, Ester C. Sabino, Nuno R. Faria, William M. De Souza, Fabiana Granja, e José Luiz Proença-Modena. 2024. Molecular Epidemiology of Mayaro Virus among Febrile Patients, Roraima State, Brazil, 2018-2021. *Emerging Infectious Diseases* 30(5):1013–16. doi: 10.3201/eid3005.231406.

2. Gabriel C Scachetti*, **Julia Forato***, Ingra M. Claro, Xinyi Hua, Bárbara B. Salgado, Aline Vieira, Camila L. Simeoni, Aguyda R. C. Barbosa, Italo L. Rosa, Gabriela F. de Souza, Luana C. N. Fernandes, Ana Carla H. de Sena, Stephanie C. Oliveira, Carolina M. L. Singh, Shirlene T. S. de Lima, Ronaldo de Jesus, Mariana A. Costa, Rodrigo B. Kato, Josilene F. Rocha, Leandro C. Santos, Janete T. Rodrigues, Marielton P. Cunha, Ester C. Sabino, Nuno R. Faria, Scott C. Weaver, Camila M. Romano, Pritesh Lalwani, José Luiz Proença-Modena, e William M. de Souza. 2024. Re-emergence of Oropouche virus between 2023 and 2024 in Brazil: an observational epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00619-4.

* Contribuição igual como primeiro autor

3. Nobrega, Guilherme de Moraes, Fabiana Granja, Luciana Pietro, Carolina Carvalho Ribeiro-do-Valle, Mariene Ribeiro Amorim, **Julia Forato**, Sherly Metelus, Carla Silveira, Renato Teixeira Souza, José Guilherme Cecatti, José Luiz Proença-Modena, e Maria Laura Costa. 2024. SARS-CoV-2 genome detection and viral viability in breast milk samples of unvaccinated postpartum women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. doi: 10.1002/ijgo.15831.

4. de Souza, William M., Shirlene T. S. de Lima, Leda M. Simões Mello, Darlan S. Candido, Lewis Buss, Charles Whittaker, Ingra M. Claro, Nilani Chandradeva, Fabiana Granja, Ronaldo de Jesus, Poliana S. Lemos, Daniel A. Toledo-Teixeira, Priscilla P. Barbosa, Antonio Carlos L. Firmino, Mariene R. Amorim, Larissa M. F. Duarte, Ivan B. Pessoa, **Julia Forato**, Irihane L. Vasconcelos, Ana Carolina B. M. Maximo, Emerson L. L. Araújo, Liana Perdigão Mello, Ester C. Sabino, José Luiz Proença-Módena, Nuno R. Faria, e Scott C. Weaver. 2023. Spatiotemporal dynamics and recurrence of

chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. *The Lancet Microbe* 4(5):e319–29. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00033-2.

5. Salgado, Bárbara Batista, Maele Ferreira Jordão, Thiago Barros do Nascimento de Morais, Danielle Severino Sena da Silva, Ivanildo Vieira Pereira Filho, Wladimir Braga Salgado Sobrinho, Nani Oliveira Carvalho, Rafaella Oliveira dos Santos, **Julia Forato**, Priscilla Paschoal Barbosa, Daniel A. Toledo-Teixeira, Kerollen Runa Pinto, Ingrid Silva Correia, Isabelle Bezerra Cordeiro, Júlio Nino de Souza Neto, Enedina Nogueira de Assunção, Fernando Fonseca Almeida Val, Gisely Cardoso Melo, Vanderson de Souza Sampaio, Wuelton Marcelo Monteiro, Fabiana Granja, William M. de Souza, Spartaco Astolfi Filho, Jose Luiz Proenca-Modena, Jaila Dias Borges Lalwani, Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Paulo Afonso Nogueira, e Pritesh Lalwani. 2023. Antigen-Specific Antibody Signature Is Associated with COVID-19 Outcome. *Viruses* 15(4). doi: 10.3390/v15041018.

6. Brunetti, Natalia S., Gustavo G. Davanzo, Diogo de Moraes, Allan J. R. Ferrari, Gabriela F. Souza, Stéfanie Primon Muraro, Thiago L. Knittel, Vinicius O. Boldrini, Lauar B. Monteiro, João Victor Virgílio-Da-silva, Gerson S. Profeta, Natália S. Wassano, Luana Nunes Santos, Victor C. Carregari, Artur H. S. Dias, Flavio P. Veras, Lucas A. Tavares, **Julia Forato**, Icaro M. S. Castro, Lícia C. Silva-Costa, André C. Palma, Eli Mansour, Raísa G. Ulaí, Ana F. Bernardes, Thyago A. Nunes, Luciana C. Ribeiro, Marcus V. Agrela, Maria Luiza Moretti, Lucas I. Buscaratti, Fernanda Crunfli, Raissa G. Ludwig, Jaqueline A. Gerhardt, Natália Munhoz-Alves, Ana Maria Marques, Renata Sesti-Costa, Mariene R. Amorim, Daniel A. Toledo-Teixeira, Pierina Lorencini Parise, Matheus Cavalheiro Martini, Karina Bispos-Dos-santos, Camila L. Simeoni, Fabiana Granja, Virgínia C. Silvestrini, Eduardo B. de Oliveira, Vitor M. Faca, Murilo Carvalho, Bianca G. Castelucci, Alexandre B. Pereira, Laís D. Coimbra, Marieli M. G. Dias, Patricia B. Rodrigues, Arilson Bernardo S. P. Gomes, Fabricio B. Pereira, Leonilda M. B. Santos, Louis Marie Bloyet, Spencer Stumpf, Marjorie C. Pontelli, Sean Whelan, Andrei C. Sposito, Robson F. Carvalho, André S. Vieira, Marco A. R. Vinolo, André Damasio, Licio Velloso, Ana Carolina M. Figueira, Luis L. P. da Silva, Thiago Mattar Cunha, Helder I. Nakaya, Henrique Marques-Souza, Rafael E. Marques, Daniel Martins-De-souza, Munir S. Skaf, Jose Luiz Proenca-Modena, Pedro M. M. Moraes-Vieira, Marcelo A. Mori, e Alessandro S. Farias. 2023. SARS-CoV-2 uses CD4 to infect T helper lymphocytes. *eLife* 12. doi: 10.7554/eLife.84790.

7. Barreto, Ester A., Amanda S. Cruz, Flavio P. Veras, Ronaldo Martins, Rafaella S. Bernardelli, Isadora M. Paiva, Thais M. Lima, Youvika Singh, Raphael C. Guimarães, Samara Damasceno, Nayara Pereira, João Manoel Alves, Tiago T. Gonçalves, **Julia Forato**, Stéfanie P. Muraro, Gabriela F. Souza, Sabrina Setembre Batah, José L. Proença-Modena, Marcelo A. Mori, Fernando Q. Cunha, Paulo Louzada-Junior, Thiago M. Cunha, Helder I. Nakaya, Alexandre Fabro, Renê D. R. de Oliveira, Eurico Arruda, Rosângela Réa, Álvaro Réa Neto, Miguel M. Fernandes da Silva, e Luiz Osório Leiria. 2023. COVID-19-related hyperglycemia is associated with infection of hepatocytes and stimulation of gluconeogenesis. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** 120(21). doi: 10.1073/pnas.2217119120.

8. Crunfli, Fernanda, Victor C. Carregari, Flavio P. Veras, Lucas S. Silva, Mateus Henrique Nogueira, Andre Saraiva Leão Marcelo Antunes, Pedro Henrique Vendramini, Aline Gazzola Fragnani Valença, Caroline Brandão-Teles, Giuliana da Silva Zuccoli, Guilherme Reis-De-Oliveira, Licia C. Silva-Costa, Verônica Monteiro Saia-Cereda, Bradley J. Smith, Ana Campos Codo, Gabriela F. de Souza, Stefanie P. Muraro, Pierina Lorencini Parise, Daniel A. Toledo-Teixeira, Icaro Maia Santos de Castro, Bruno Marcel Melo, Glaucia M. Almeida, Egidi Mayara Silva Firmino, Isadora Marques Paiva, Bruna Manuella Souza Silva, Rafaela Mano Guimarães, Niele D. Mendes, Raissa L. Ludwig, Gabriel P. Ruiz, Thiago L. Knittel, Gustavo G. Davanzo, Jaqueline Aline Gerhardt, Patricia Brito Rodrigues, **Julia Forato**, Mariene Ribeiro Amorim, Natalia S. Brunetti, Matheus Cavalheiro Martini, Maira Nilson Benatti, Sabrina S. Batah, Li Siyuan, Rafael B. João, Italo K. Aventurato, Mariana Rabelo de Brito, Maria J. Mendes, Beatriz A. da Costa, Marina K. M. Alvim, Jose Roberto da Silva Junior, Livia L. Damião, Iêda Maria P. de Sousa, Elessandra D. da Rocha, Solange M. Gonçalves, Luiz H. Lopes da Silva, Vanessa Bettini, Brunno M. Campos, Guilherme Ludwig, Lucas Alves Tavares, Marjorie Cornejo Pontelli, Rosa Maria Mendes Viana, Ronaldo B. Martins, Andre Schwambach Vieira, Jose Carlos Alves-Filho, Eurico Arruda, Guilherme Gozzoli Podolsky-Gondim, Marcelo Volpon Santos, Luciano Neder, Andre Damasio, Stevens Rehen, Marco Aurelio Ramirez Vinolo, Carolina Demarchi Munhoz, Paulo Louzada-Junior, Renê Donizeti Oliveira, Fernando Q. Cunha, Helder I. Nakaya, Thais Mauad, Amaro Nunes Duarte-Neto, Luiz Fernando Ferraz da Silva, Marisa Dolhnikoff, Paulo Hilario Nascimento Saldiva, Alessandro S. Farias, Fernando Cendes, Pedro Manoel M. Moraes-Vieira, Alexandre T. Fabro, Adriano Sebollela, Jose L. Proença-Modena, Clarissa L. Yasuda, Marcelo A. Mori, Thiago M. Cunha, e Daniel Martins-De-Souza. 2022. Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. ***Proceedings of***

the National Academy of Sciences of the United States of America 119(35). doi: 10.1073/pnas.2200960119.

9. Saccon, Tatiana Dandolini, Felipe Mousovich-Neto, Raissa Guimarães Ludwig, Victor Corasolla Carregari, Ana Beatriz dos Anjos Souza, Amanda Stephane Cruz dos Passos, Matheus Cavalheiro Martini, Priscilla Paschoal Barbosa, Gabriela Fabiano de Souza, Stéfanie Primon Muraro, **Julia Forato**, Mariene Ribeiro Amorim, Rafael Elias Marques, Flavio Protasio Veras, Ester Barreto, Tiago Tomazini Gonçalves, Isadora Marques Paiva, Narayana P. B. Fazolini, Carolina Mie Kawagosi Onodera, Ronaldo Bragança Martins Junior, Paulo Henrique Cavalcanti de Araújo, Sabrina Setembro Batah, Rosa Maria Mendes Viana, Danilo Machado de Melo, Alexandre Todorovic Fabro, Eurico Arruda, Fernando Queiroz Cunha, Thiago Mattar Cunha, Marco Antônio M. Pretti, Bradley Joseph Smith, Henrique Marques-Souza, Thiago L. Knittel, Gabriel Palermo Ruiz, Gerson S. Profeta, Tereza Cristina Minto Fontes-Cal, Mariana Boroni, Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Alessandro S. Farias, Pedro Manoel M. Moraes-Vieira, Joyce Maria Annichino Bizzacchi, Tabet Teesalu, Felipe David Mendonça Chaim, Everton Cazzo, Elinton Adami Chaim, José Luiz Proença-Módena, Daniel Martins-de-Souza, Mariana Kiomy Osako, Luiz Osório Leiria, e Marcelo A. Mori. 2022. SARS-CoV-2 infects adipose tissue in a fat depot- and viral lineage-dependent manner. ***Nature Communications*** 13(1). doi: 10.1038/s41467-022-33218-8.

10. Sabino, Janine S., Mariene R. Amorim, William M. de Souza, Lia F. Marega, Luciana S. Mofatto, Daniel A. Toledo-Teixeira, **Julia Forato**, Rodrigo G. Stabeli, Maria Laura Costa, Fernando R. Spilki, Ester C. Sabino, Nuno R. Faria, Bruno D. Benites, Marcelo Addas-Carvalho, Raquel S. B. Stucchi, Dewton M. Vasconcelos, Scott C. Weaver, Fabiana Granja, José Luiz Proença-Modena, e Maria Marluce Dos S. Vilela. 2022. Clearance of Persistent SARS-CoV-2 RNA Detection in a NFκB-Deficient Patient in Association with the Ingestion of Human Breast Milk: A Case Report. ***Viruses*** 14(5). doi: 10.3390/v14051042.

11. de Souza, William M., Stéfanie P. Muraro, Gabriela F. Souza, Mariene R. Amorim, Renata Sesti-Costa, Luciana S. Mofatto, **Julia Forato**, Priscilla P. Barbosa, Daniel A. Toledo-Teixeira, Karina Bispo-Dos-santos, Pierina L. Parise, Natalia S. Brunetti, Joselia C. O. Moreira, Vitor A. Costa, Daniela M. Cardozo, Maria L. Moretti, Silvia Barros-Mazon, Gabriela F. Marchesi, Christiane Ambrosio, Fernando R. Spilki, Valeria C. Almeida, Andre S. Vieira, Lair Zambon, Alessandro S. Farias, Marcelo Addas-Carvalho, Bruno D. Benites, Rafael E. Marques, Ester C. Sabino, Andrea B. Von Zuben, Scott C. Weaver,

Nuno R. Faria, Fabiana Granja, Rodrigo N. Angerami, e José Luiz Proença-Módena. 2021. Clusters of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 infection after vaccination with adenovirus-vectored and inactivated vaccines. **Viruses** 13(11). doi: 10.3390/v13112127.

12. Silva-Filho, Joao Luiz, Lilian G. de Oliveira, Leticia Monteiro, Pierina L. Parise, Nagela G. Zanluqui, Carolina M. Polonio, Carla L. de Freitas, Daniel A. Toledo-Teixeira, William M. de Souza, Najara Bittencourt, Mariene R. Amorim, **Julia Forato**, Stéfanie P. Muraro, Gabriela F. de Souza, Matheus C. Martini, Karina Bispo-dos-Santos, Aline Vieira, Carla C. Judice, Glaucia M. Pastore, Eliana Amaral, Renato Passini Junior, Helaine M. B. P. Mayer-Milanez, Carolina C. Ribeiro-do-Valle, Roseli Calil, João Renato Bennini Junior, Giuliane J. Lajos, Albina Altemani, Marcos T. Nolasco da Silva, Ana Carolina Coan, Maria Francisca Colella-Santos, Andrea P. B. von Zuben, Marco Aurélio R. Vinolo, Clarice Weis Arns, Rodrigo Ramos Catharino, Maria Laura Costa, Rodrigo N. Angerami, André R. R. Freitas, Mariangela R. Resende, Márcia T. Garcia, Maria Luiza Moretti, Laurent Renia, Lisa F. P. Ng, Carla V. Rothlin, Fabio T. M. Costa, Jean Pierre Schatzmann Peron, e José Luiz Proença-Modena. 2021. *Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice.* **Brain, Behavior, and Immunity** 97:260–74. doi: 10.1016/j.bbi.2021.08.008.

13. Amorim, Mariene R., William M. Souza, Antonio C. G. Barros, Daniel A. Toledo-Teixeira, Karina Bispo dos-Santos, Camila L. Simeoni, Pierina L. Parise, Aline Vieira, **Julia Forato**, Ingra M. Claro, Luciana S. Mofatto, Priscila P. Barbosa, Natalia S. Brunetti, Emerson S. S. França, Gisele A. Pedroso, Barbara F. N. Carvalho, Tania R. Zaccariotto, Kamila C. S. Krywacz, André S. Vieira, Marcelo A. Mori, Alessandro S. Farias, Maria H. P. Pavan, Luís Felipe Bachur, Luís G. O. Cardoso, Fernando R. Spilki, Ester C. Sabino, Nuno R. Faria, Magnun N. N. Santos, Rodrigo Angerami, Patricia A. F. Leme, Angelica Schreiber, Maria L. Moretti, Fabiana Granja, e José Luiz Proença-Modena. 2021. Respiratory Viral Shedding in Healthcare Workers Reinfected with SARS-CoV-2, Brazil, 2020. **Emerging Infectious Diseases** 27(6):1737–40. doi: 10.3201/eid2706.210558.

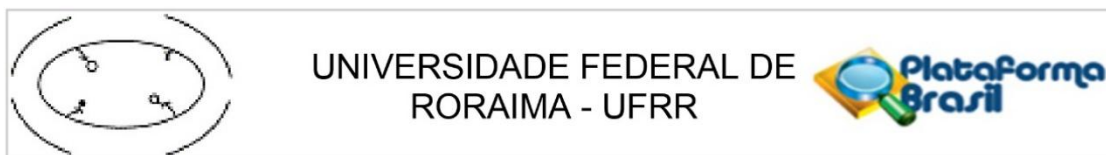
14. Venceslau, Emanuella Meneses, José Paulo Siqueira Guida, Guilherme de Moraes Nobrega, Ana Paula Samogim, Pierina Lorencini Parise, Rodolfo Rosa Japecanga, Daniel Augusto de Toledo-Teixeira, **Julia Forato**, Arthur Antolini-Tavares, Arethusa Souza, Albina Altemani, Silvio Roberto Consonni, Renato Passini, Eliana Amaral, Jose Luiz Proença-Modena, e Maria Laura Costa. 2020. Adequate Placental Sampling for the Diagnosis and Characterization of Placental Infection by Zika Virus. **Frontiers in Microbiology** 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00112.

15. Candido, Darlan S., Ingra M. Claro, Jaqueline G. de Jesus, William M. Souza, Filipe R. R. Moreira, Simon Dellicour, Thomas A. Mellan, Louis du Plessis, Rafael H. M. Pereira, Flavia C. S. Sales, Erika R. Manuli, Julien Thézé, Luiz Almeida, Mariane T. Menezes, Carolina M. Voloch, Marcilio J. Fumagalli, Thaís M. Coletti, Camila A. M. da Silva, Mariana S. Ramundo, Mariene R. Amorim, Henrique H. Hoeltgebaum, Swapnil Mishra, Mandev S. Gill, Luiz M. Carvalho, Lewis F. Buss, Carlos A. Prete, Jordan Ashworth, Helder I. Nakaya, Pedro S. Peixoto, Oliver J. Brady, Samuel M. Nicholls, Amilcar Tanuri, Átila D. Rossi, Carlos K. V. Braga, Alexandra L. Gerber, Ana Paula C. de Guimarães, Nelson Gaburo, Cecila Salette Alencar, Alessandro C. S. Ferreira, Cristiano X. Lima, José Eduardo Levi, Celso Granato, Giulia M. Ferreira, Ronaldo S. Francisco, Fabiana Granja, Marcia T. Garcia, Maria Luiza Moretti, Mauricio W. Perroud, Terezinha M. P. P. Castiñeiras, Carolina S. Lazari, Sarah C. Hill, Andreza Aruska de Souza Santos, Camila L. Simeoni, **Julia Forato**, Andrei C. Sposito, Angelica Z. Schreiber, Magnun N. N. Santos, Camila Zolini de Sá, Renan P. Souza, Luciana C. Resende-Moreira, Mauro M. Teixeira, Josy Hubner, Patricia A. F. Leme, Rennan G. Moreira, Maurício L. Nogueira, Neil M. Ferguson, Silvia F. Costa, José Luiz Proenca-Modena, Ana Tereza R. Vasconcelos, Samir Bhatt, Philippe Lemey, Chieh Hsi Wu, Andrew Rambaut, Nick J. Loman, Renato S. Aguiar, Oliver G. Pybus, Ester C. Sabino, e Nuno Rodrigues Faria. 2020. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. ***Science*** 369(6508):1255–60. doi: 10.1126/SCIENCE.ABD2161.

16. Amorim, Mariene Ribeiro, Marjorie Cornejo Pontelli, Gabriela Fabiano de Souza, Stéfanie Primon Muraro, Daniel A. Toledo-Teixeira, **Julia Forato**, Karina Bispo-Dos-Santos, Natália S. Barbosa, Matheus Cavalheiro Martini, Pierina Lorencini Parise, Aline Vieira, Guilherme Paier Milanez, Luis Lamberti Pinto da Silva, Pritesh Jaychand Lalwani, Alessandro Santos Farias, Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Renata Sesti-Costa, Eurico Arruda, e Jose Luiz Proenca-Modena. 2020. Oropouche virus infects, persists and induces IFN response in human peripheral blood mononuclear cells as identified by RNA PrimeFlow and qRT-PCR assays. ***Viruses*** 12(7). doi: 10.3390/v12070785.

9.3. Parecer comitê de ética

Universidade Federal de Roraima (nº 2.881.239)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO ECOEPIDEMIOLÓGICO DE ARBOVÍRUS EM UM ESTADO DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA

Pesquisador: Fabiana Granja

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 89266618.8.0000.5302

Instituição Proponente: Universidade Federal de Roraima - UFR

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

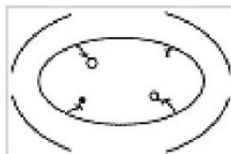
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.881.239

Apresentação do Projeto:

A Amazônia Ocidental brasileira é constituída pelos estados de Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima (Brasil, 1967), e detém aproximadamente 43% da extensão da Amazônia Legal do Brasil. Os arbovírus são vírus que necessitam de um artrópode vetor para completar seu ciclo biológico, sendo transmitidos para hospedeiros vertebrados que atuam como amplificadores no ciclo (KUNO; CHANG, 2005). Na Amazônia brasileira, 210 espécies de arbovírus já foram encontradas, sendo 16% capazes de infectar o homem (CASSEB et al., 2013). Nos últimos anos vários arbovírus foram identificados em surtos no Brasil, estando alguns destes vírus ligados a complicações ou sequelas nos pacientes. Vários surtos de Dengue foram registrados no Brasil desde 1981, com registro de um surto massivo envolvendo 21 estados em 2010 (FARES et al., 2015). Os vírus Chikungunya e Zika foram detectados no país em 2014 e 2015, respectivamente, e, posteriormente, o último foi associado ao aumento no número de casos de microcefalia no país ao final de 2015 e outras malformações congênitas (LIMA-CÂMARA, 2016; SAAD et al, 2018). Roraima é uma importante localidade do ponto de vista epidemiológico, por sua fronteira com países da América do Sul (Venezuela e Guiana) e proximidade ao Caribe, configurando então uma porta de entrada para patógenos no território nacional. Historicamente, Roraima foi o estado brasileiro onde primeiro se confirmou laboratorialmente um surto de dengue, com detecção dos sorotipos 1 e 4 entre 1981-1982 (OSANAI et al, 1983; ACOSTA et al., 2012). Com a reintrodução do DENV-4 em Roraima (2010), a partir da Venezuela, esta rota ganhou novo destaque. Interessantemente, Faria et al.

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br



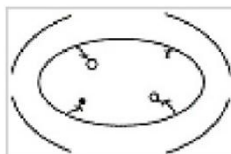
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 2.881.239

(2017) encontrou fortes evidências moleculares de introdução do DENV-4 no Brasil a partir da região Norte, mais especificamente Roraima, em concordância com as observações de Acosta et al. (2012). A exemplo do DENV-4, vários casos importados de Febre do Chikungunya provenientes da Venezuela e Guiana foram reportados no segundo semestre de 2014, reforçando a hipótese de Roraima como porta de entrada para arbovírus. Os dados epidemiológicos demonstram a circulação contínua do vírus Dengue em Roraima de 1999 a 2015, com circulação de um ou mais sorotipos em todos os anos estudados e co-circulação dos quatro sorotipos de DENV desde 2010, com exceção de 2011, e alta incidência de casos da doença (ACOSTA et al., 2012; BRASIL, 2015, 2016, 2017). Em 2017 um grande surto de Febre do Chikungunya ocorreu em Roraima, com notificação de 6504 casos prováveis e confirmação laboratorial de 60,6% destes (RORAIMA, 2018). Ainda assim, mais de 3.000 casos permanecem negativos para Dengue ou Chikungunya, existindo a possibilidade de serem causados por outros arbovírus, ou por outros vírus cuja infecção humana leva a sintomas semelhantes. Cabe destacar que, em 2013, casos falso-negativos para Dengue foram detectados entre amostras negativas para detecção do antígeno NS1 por ELISA (ACOSTA et al., 2014). Tendo em vista estes dados, a vigilância virológica de arbovírus se apresenta como fator crucial para a definição de estratégias de combate, sendo importante a avaliação do papel dos vetores nos ciclos de transmissão. Estudos sobre a transmissão transovariana de arbovírus pode auxiliar no monitoramento e detecção prévia de circulação viral. Um recente estudo no Amazonas revelou taxas de transmissão transovariana de vírus Dengue em *Ae. aegypti* de 46% e taxa mínima de infecção pelo vírus de 17,7/1000 larvas, além da detecção dos quatro sorotipos do vírus Dengue (DA COSTA et al., 2017). Mosquitos adultos infectados também podem ter papel importante na manutenção de arbovírus no meio ambiente, devido à transmissão venérea entre machos e fêmeas da mesma espécie. Em 2016, foi registrada a existência de *Ae. aegypti* adultos de ambos os sexos infectados pelo vírus Zika no Rio de Janeiro (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016) e, mais recentemente, pesquisadores da FIOCRUZ Amazônia verificaram a transmissão venérea do Zika entre mosquitos *Ae. aegypti* em condições laboratoriais (PEREIRA-SILVA et al., 2018). Um estudo anterior realizado em Roraima não encontrou evidências de transmissão transovariana (ZEIDLER et al., 2008), entretanto a técnica utilizada à época não apresentava a sensibilidade das técnicas de detecção de ácidos nucleicos atuais. Considerando os fatos anteriormente mencionados, há uma lacuna com relação à detecção de arbovírus em Roraima, assim como dos efeitos nos hospedeiros e contribuição dos mosquitos vetores. Estudos relacionados às características ambientais, epidemiológicas e moleculares destes arbovírus podem embasar novas estratégias em Saúde Pública, auxiliar na definição de estratégias de combate aos vetores, assim

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufrr.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR

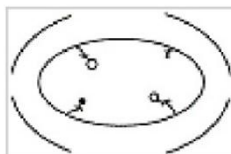


Continuação do Parecer: 2.881.239

como, permitir uma vigilância virológica, impactando positivamente, de forma direta ou indireta, a sociedade.

Metodologia Proposta: Amostragem: a coleta de mosquitos (adultos e larvas) e amostras biológicas de pacientes somente será realizada após a assinatura do termo de consentimento pelos indivíduos envolvidos na pesquisa. No caso dos pacientes, estes serão consultados quanto ao uso de alíquota de material biológico existente no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-RR), sendo estas alíquotas armazenadas em biorrepositório durante a pesquisa. Os dados obtidos em instituições parceiras serão fornecidos com garantia de sigilo da identidade de indivíduos de forma a preservar a privacidade e confidencialidade dos mesmos. Pesquisa de arbovírus em mosquitos adultos e larvas: ovos de mosquito serão coletados em ovitrampas, eclodidos em laboratório e mantidas até estágio larval L3/L4. Mosquitos adultos serão coletados utilizando-se aspirador de Nasci no intra e peridomicílio, posteriormente separados por sexo e local de coleta. Larvas e adultos serão separados em pools de 20 indivíduos e acondicionados a -80°C até a extração de RNA. O RNA será extraído dos pools macerando os indivíduos com Trizol LS, seguindo o protocolo do fabricante. Os arbovírus serão detectados por meio de PCR em tempo real e as amostras positivas serão sequenciadas com uso de primers específicos. Detecção e caracterização de arbovírus em pacientes com síndrome febril indiferenciada e em casos atípicos: Dados relacionados aos casos de arbovirose confirmados (casos positivos) no LACEN-RR serão coletados e as amostras correspondentes serão levadas para sequenciamento do material genético dos vírus no Laboratório de Biologia Molecular/UFRR. Os casos atípicos terão arbovírus pesquisados no Laboratório de Biologia Molecular/UFRR por meio de RT-PCR em tempo real. As amostras negativas para dengue, zika ou chikungunya destes dois fluxos serão enviadas para Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis/Fiocruz Amazônia para pesquisa de arbovírus por metagenômica. Efeitos da infecção congênita por arbovírus: em casos de gestantes com infecção confirmada, os dados clínicos e sócio-demográficos de recém-nascidos e das puérperas serão coletados em unidades de saúde, de forma a se verificar associação entre a infecção e desfecho clínico. Em casos oportunos e obtido o consentimento, amostras biológicas (sangue, amostras de placenta, cordão umbilical, tecidos provenientes do natimorto ou feto) serão coletadas para verificação de passagem dos vírus pela barreira placentária. Distribuição espaço-temporal em Boa Vista/RR: a partir de dados obtidos do SINAN e da pesquisa de arbovírus em mosquitos, mapas de distribuição dos casos humanos e de pools de mosquito positivos serão produzidos, com cobertura bimestral dos dados. Análises filogenéticas e estudo de rotas de introdução: as

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufrr.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 2.881.239

sequências nucleotídicas obtidas no estudo terão a identidade do arbovírus confirmada em plataforma internacional (ferramenta BLAST). Um dataset será gerado com as sequências obtidas e com sequências de outros estudos e análises filogenéticas serão realizadas nos aplicativos BEAST e MEGA para verificar a similaridade com outros isolados de estados brasileiros ou outros países. Análises filogeográficas serão realizadas com os mesmos datasets para verificação de rotas de introdução/dispersão destes arbovírus nas ferramentas BEAST em sua versão mais recente.

Critério de Inclusão: Pacientes admitidos em unidades de saúde do estado de Roraima que apresentem sinais e sintomas sugestivos para infecção por arbovírus, assim como mosquitos (adultos e larvas) coletados em residência previamente escolhida com base em dados na Unidade de Vigilância em Saúde. **Critério de Exclusão:** Serão excluídos deste estudo aqueles indivíduos que não possuam Ficha de Notificação de Agravos de arboviroses (dengue, zika, chikungunya ou CID A90-A99) ou cujo material biológico apresente volume 300µL e que não assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou o Termo de Assentimento.

Objetivo da Pesquisa:

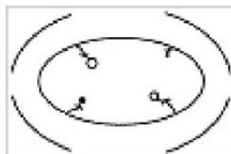
Objetivo Primário: Estudar fatores ecoepidemiológicos relacionados a arbovírus de importância médica circulantes no Estado de Roraima.

Objetivo Secundário: 1) Verificar a ocorrência de transmissão transovariana em larvas de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*; 2) Identificar arbovírus em mosquitos adultos naturalmente infectados no município de Boa Vista; 3) Investigar a presença de arbovírus dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* e família *Peribunyaviridae* (ex-Bunyaviridae) em amostras de pacientes com síndrome febril indiferenciada; 4) Pesquisar a presença de arbovírus em casos humanos atípicos, incluindo manifestações neurológicas e congênitas; 5) Caracterizar, por ferramentas moleculares, arbovírus presentes em amostras de pacientes comprovadamente infectados; 6) Verificar os efeitos da infecção por arbovírus durante a gestação e sobre o desenvolvimento de crianças nascidas de mães comprovadamente infectadas por arbovírus; 7) Analisar a distribuição espaço-temporal de casos de infecção por arbovírus no município de Boa Vista; e, 8) Inferir as dinâmicas filogeográficas e características filogenéticas de arbovírus epidêmicos no Estado de Roraima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Durante a execução do projeto há risco de constrangimento durante a coleta de material principalmente a coleta de mosquitos e ou larvas nas residências e risco diminuído de

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 2.881.239

identificação, já que as amostras são provenientes de unidades de saúde, local onde já ocorre a coleta de exames para identificação da doença. Benefícios: Entre os benefícios estão a identificação do vírus causador de doença, a promoção de ações para combate de mosquitos vetores e indiretamente, o planejamento de ações para identificação e prevenção de arbovírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito relevante, apresentou na versão 2 todas as adequações solicitadas por esse Comitê de ética em Pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória constam no projeto de pesquisa.

Recomendações:

Não há recomendações necessárias

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

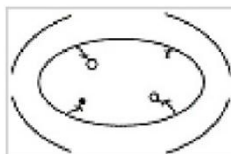
Recomenda-se a aprovação do protocolo de pesquisa, pois não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1127415.pdf	15/08/2018 13:20:20		Aceito
Outros	Planilha_Publicacao_DOU_3893714196383573.pdf	15/08/2018 13:19:09	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_estudo_arbovirus.pdf	15/08/2018 13:16:09	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	15/08/2018 13:15:04	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_pendencias_COEP.pdf	13/07/2018 00:28:22	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_arbovirus.pdf	13/07/2018 00:27:20	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_arbovirus.pdf	13/07/2018 00:26:57	ISMAEL ALEXANDRE DA	Aceito

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 2.881.239

Justificativa de Ausência	TCLE_arbovirus.pdf	13/07/2018 00:26:57	NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_arbovirus_gravidas.pdf	13/07/2018 00:25:57	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA NASCIMENTO	Aceito
Outros	TCUD.pdf	06/05/2018 22:34:51	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_LACEN.pdf	02/05/2018 23:25:17	Fabiana Granja	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOA VISTA, 09 de Setembro de 2018

Assinado por:
MANUELA SOUZA SIQUEIRA CORDEIRO
(Coordenador)

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

Universidade Estadual de Campinas (nº 5.625.875)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO ECOEPIDEMIOLÓGICO DE ARBOVÍRUS EM UM ESTADO DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA

Pesquisador: Fabiana Granja

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 89266618.8.3003.5404

Instituição Proponente: Instituto de Biologia - Unicamp

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.625.875

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada. Trata-se de PROTOCOLO EM COPARTICIPAÇÃO (POc) originalmente aprovado pelo CEP da UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA – UFRR em 08/03/2022.

Introdução: A Amazônia Ocidental brasileira é constituída pelos estados de Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima (Brasil, 1967), e detém aproximadamente 43% da extensão da Amazônia Legal do Brasil. Os arbovírus são vírus que necessitam de um artrópode vetor para completar seu ciclo biológico, sendo transmitidos para hospedeiros vertebrados que atuam como amplificadores no ciclo (KUNO; CHANG, 2005). Na Amazônia brasileira, 210 espécies de arbovírus já foram encontradas, sendo 16% capazes de infectar o homem (CASSEB et al., 2013). Nos últimos anos vários arbovírus foram identificados em surtos no Brasil, estando alguns destes vírus ligados a complicações ou sequelas nos pacientes. Vários surtos de Dengue foram registrados no Brasil desde 1981, com registro de um surto massivo envolvendo 21 estados em 2010 (FARES et al., 2015). Os vírus Chikungunya e Zika foram detectados no país em 2014 e 2015, respectivamente, e, posteriormente, o último foi associado ao aumento no número de casos de microcefalia no país ao final de 2015 e outras malformações congênitas (LIMA-CÂMARA, 2016; SAAD et al, 2018).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

Roraima é uma importante localidade do ponto de vista epidemiológico, por sua fronteira com países da América do Sul (Venezuela e Guiana) e proximidade ao Caribe, configurando então uma porta de entrada para patógenos no território nacional. Historicamente, Roraima foi o estado brasileiro onde primeiro se confirmou laboratorialmente um surto de dengue, com detecção dos sorotipos 1 e 4 entre 1981-1982 (OSANAI et al, 1983; ACOSTA et al., 2012). Com a reintrodução do DENV-4 em Roraima (2010), a partir da Venezuela, esta rota ganhou novo destaque. Interessantemente, Faria et al. (2017) encontrou fortes evidências moleculares de introdução do DENV-4 no Brasil a partir da região Norte, mais especificamente Roraima, em concordância com as observações de Acosta et al. (2012). A exemplo do DENV-4, vários casos importados de Febre do Chikungunya provenientes da Venezuela e Guiana foram reportados no segundo semestre de 2014, reforçando a hipótese de Roraima como porta de entrada para arbovírus. Os dados epidemiológicos demonstram a circulação contínua do vírus Dengue em Roraima de 1999 a 2015, com circulação de um ou mais sorotipos em todos os anos estudados e co-circulação dos quatro sorotipos de DENV desde 2010, com exceção de 2011, e alta incidência de casos da doença (ACOSTA et al., 2012; BRASIL, 2015, 2016, 2017). Em 2017 um grande surto de Febre do Chikungunya ocorreu em Roraima, com notificação de 6504 casos prováveis e confirmação laboratorial de 60,6% destes (RORAIMA, 2018). Ainda assim, mais de 3.000 casos permanecem negativos para Dengue ou Chikungunya, existindo a possibilidade de serem causados por outros arbovírus, ou por outros vírus cuja infecção humana leva a sintomas semelhantes. Cabe destacar que, em 2013, casos falso-negativos para Dengue foram detectados entre amostras negativas para detecção do antígeno NS1 por ELISA (ACOSTA et al., 2014). Tendo em vista estes dados, a vigilância virológica de arbovírus se apresenta como fator crucial para a definição de estratégias de combate, sendo importante a avaliação do papel dos vetores nos ciclos de transmissão. Estudos sobre a transmissão transovariana de arbovírus pode auxiliar no monitoramento e detecção prévia de circulação viral. Um recente estudo no Amazonas revelou taxas de transmissão transovariana de vírus Dengue em *Ae. aegypti* de 46% e taxa mínima de infecção pelo vírus de 17,7/1000 larvas, além da detecção dos quatro sorotipos do vírus Dengue (DA COSTA et al., 2017). Mosquitos adultos infectados também podem ter papel importante na manutenção de arbovírus no meio ambiente, devido à transmissão venérea entre machos e fêmeas da mesma espécie. Em 2016, foi registrada a existência de *Ae. aegypti* adultos de ambos os sexos infectados pelo vírus Zika no Rio de Janeiro (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016) e, mais recentemente, pesquisadores da FIOCRUZ Amazônia verificaram a transmissão venérea do Zika entre mosquitos *Ae. aegypti* em condições laboratoriais (PEREIRA-SILVA et al., 2018). Um estudo anterior realizado em Roraima não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

encontrou evidências de transmissão transovariana (ZEIDLER et al., 2008), entretanto a técnica utilizada à época não apresentava a sensibilidade das técnicas de detecção de ácidos nucleicos atuais. Considerando os fatos anteriormente mencionados, há uma lacuna com relação à detecção de arbovírus em Roraima, assim como dos efeitos nos hospedeiros e contribuição dos mosquitos vetores. Estudos relacionados às características ambientais, epidemiológicas e moleculares destes arbovírus podem embasar novas estratégias em Saúde Pública, auxiliar na definição de estratégias de combate aos vetores, assim como, permitir uma vigilância virológica, impactando positivamente, de forma direta ou indireta, a sociedade.

DELINEAMENTO DA PESQUISA: Trata-se de estudo observacional, de caráter transversal que inclui: 1) detecção e caracterização molecular de arbovírus em larvas e adultos de mosquitos, 2) Caracterização molecular dos arbovírus que podem estar infectando humanos infectados; e, 3) análise de dados epidemiológicos desses pacientes notificados e/ou com síndrome febril. Serão envolvidas amostras de cerca de 400 indivíduos que tenham sido diagnosticados com síndrome febril aguda do estado de Roraima, coletadas junto ao Lacen/RR (Laboratórios Centrais de Saúde Pública de Roraima), a partir de pacientes atendidos entre janeiro de 2019 e dezembro de 2020.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras: Serão utilizadas até 400 amostras armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular (LabMol) da Universidade Federal de Roraima (UFRR). Essas amostras foram ou serão analisadas previamente pelo Lacen/RR (Laboratórios Centrais de Saúde Pública de Roraima), a partir de pacientes com síndrome febril e suspeita para arboviroses atendidos entre janeiro de 2019 a dezembro de 2020. Esses pacientes foram ou serão procedentes das comunidades distribuídas por todo estado de Roraima, podendo ser consideradas uma representação significativa de todo o estado. Para a realização desse estudo as amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) da Universidade Estadual de Campinas para realização das análises. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética Número do Parecer: 2.881.239 (certificado de apresentação para consideração ética) de 09 de setembro de 2018.

Extração dos ácidos nucleicos: As amostras serão processadas no Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes da Unicamp onde realizaremos a extração do RNA viral com o kit QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em todas as extrações será utilizada uma amostra controle juntamente com as amostras dos pacientes sendo um controle negativo para evitar contaminações durante esse processo. O produto de todas as extrações será

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

analisado no espectrofotômetro NanoDrop™ One/One (Thermo Fischer Scientific, EUA) para determinar a absorbância nos comprimentos de 230/260nm e verificar assim, a quantidade e qualidade do RNA obtido. Rt-qPCR para os principais vírus circulantes em Roraima Todas as amostras deste estudo serão avaliadas por RT-qPCR para investigação da presença dos vírus: ZIKV, DENV (1-4), CHIKV, MAYV e OROV, sendo realizada a detecção por RT-PCR tempo real usando o kit TaqMan RNA to-Ct 1-Step (Applied Biosystems, EUA).

Sequenciamento nucleotídico de alto desempenho na plataforma Illumina: Submeteremos todas as amostras negativas (em pool de 10) todas as positivas para OROV e MAYV ao sequenciamento de alto desempenho para a determinação do viroma e/ou sequenciamento completo do genoma viral. Os extratos de RNA com uma concentração 2µg em 50µl serão enviados ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Universidade de Campinas. Em seguida, serão submetidos a transcrição reversa com primers randômicos e a enzima SuperScript II (Invitrogen, EUA), seguindo instruções do fabricante. Em seguida, os produtos da reação serão purificados e construídas as bibliotecas para o sequenciamento utilizando o kit Nextera® XT DNA Sample Preparation (Illumina, EUA), conforme descrito pelo fabricante. Posteriormente, submeteremos às bibliotecas ao sequenciamento no equipamento HiSeq 2500 (Illumina, EUA) utilizando o TruSeq DNA Sample Preparation. Os sequenciamentos serão feitos por leitura “paired-end” com reads de 2x150bp, gerando aproximadamente 300 milhões de reads por lane. Os dados gerados serão analisados como análise por bioinformática como descrito abaixo.

Montagem de genomas virais: Para a montagem dos genomas virais a partir dos dados gerados na plataforma HiSeq 2500, utilizaremos a pipeline MetaViC (<https://github.com/sejmodha/MetaViC>). Esta abordagem é dividida em duas etapas: remoção de reads (sequências) não virais (Figura 1.a), e em seguida montagens dos genomas com os reads filtrados (Figura 1.b). Posteriormente, os contigs serão manualmente separados a partir dos arquivos de saída dos montadores, para as análises posteriores. Após a conclusão do estudo, todos os dados primários de sequenciamento serão depositados e disponibilizados no Sequence Read Archive (SRA) no NCBI. Também, todas as sequências virais obtidas serão disponibilizadas no GenBank.

Caracterização genômica dos vírus: Para caracterizar o genoma ou genes virais, verificaremos as sequências dos genomas virais manualmente quando necessário com o programa Geneious 9.1.2 (Biomatters, New Zealand). ORFs de genomas virais e massa molecular de cada uma das proteínas virais identificadas serão preditas com o programa Geneious 9.1.2. Para determinar domínios de proteínas serão utilizados os programas InterProScan e o Conserved Domain Database

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

(MARCHLER- BAUER et al., 2004; ZDOBNOV; APWEILER, 2001). Também, regiões transmembrânicas e peptídeo sinal serão identificados com o TOPCONS webserver (BERNSEL et al., 2009). Motifs característicos serão identificados com o programa Geneious 9.1.2 baseado no alinhamento com aminoácidos.

Conjuntos de dados, alinhamento e determinação do melhor modelo estatístico: As espécies virais identificadas serão analisadas separadamente, e alinhadas a um conjunto de sequências de genomas virais das mesmas famílias virais disponíveis no Genbank. Cada conjunto de sequências será submetido ao programa DAMBE 6 para excluir sequências idênticas (XIA; XIE, 2001). Alinhamentos serão feitos com os programas MAFFT, Muscle ou RevTrans (EDGAR, 2004; KATO et al., 2002; WERNERSSON; PEDERSEN, 2003) e submetidos ao programa JModelTest (DARRIBA et al., 2012), e os aminoácidos ao programa ProtTest3 (DARRIBA et al., 2011), para identificar os melhores modelos de substituições em nucleotídeos ou aminoácidos nas análises filogenéticas. Nestes programas são implementados três critérios estatísticos para definir o melhor modelo estatístico, são eles: hLRT (hierarchical likelihood ratio tests), o AIC (Akaike Information Criterion) e o critério BIC (Bayesian Information Criterion)

Árvores filogenéticas: Para inferir a classificação taxonômica dos novos vírus, bem como seus processos evolutivos, as árvores filogenéticas serão construídas por métodos probabilísticos de máxima verossimilhança usando o programa IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015). Análises filogenéticas serão feitas segundo o melhor modelo estatístico previamente definido. Os suportes estatísticos das árvores filogenéticas serão calculados com bootstrap para 1000 réplicas, visualizadas e editadas com o Figtree.

Análise de recombinant

Análise de recombinantes e reassortments: Para identificar potenciais eventos de recombinação ou reassortments serão observados as topologias das árvores filogenéticas em conjunto com análises por métodos Bootscan, Geneconv, Chimerax, MaxChi e RDP, com o programa RDP4 (MARTIN et al., 2015). Nas análises com o RDP4 utilizaremos alinhamentos de regiões codificantes completas, ou de todos os genes dos vírus segmentados concatenados.

Critérios de inclusão (como descritos na PB): Pacientes admitidos em unidades de saúde do estado de Roraima que apresentem sinais e sintomas sugestivos para infecção por arbovírus, assim como mosquitos (adultos e larvas) coletados em residência previamente escolhida com base em dados na Unidade de Vigilância em Saúde.

Critérios de exclusão (como descritos na PB): Serão excluídos deste estudo aqueles indivíduos que não possuam Ficha de Notificação de Agravos de arboviroses (dengue, zika, chikungunya ou CID A90-A99) ou cujo material biológico apresente volume 300µL e que não assinarem o Termo de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

Consentimento Livre e Esclarecido ou o Termo de Assentimento.

Metodologia de análise de dados: Com a definição da espécie de arbovírus nos casos estudados serão analisadas possíveis prevalências de espécies, assim como a prevalência de sintomas por arbovírus e a prevalência de sintomas por classificação da doença, todas por meio do teste de χ^2 (Chi-quadrado) ou exato de Fisher. Os números de casos causados por cada arbovírus serão comparados entre os anos, e também conforme a presença de sinais ou sintomas de casos graves, por meio do teste χ^2 . O número de sintomas relatados serão comparados entre os arbovírus por meio do teste t de Student. Em todos os testes estatísticos será considerado nível de significância de 5%, com o objetivo de verificar-se a existência de substituição entre os sorotipos no período estudado. Os dados obtidos a partir do SINAN ou de prontuários dos pacientes assim como dados de pesquisa de arbovírus em larvas e mosquitos adultos serão utilizados para a construção de mapas bimestrais, baseados na notificação de casos suspeitos de arbovirose, casos confirmados de arbovirose em humanos e locais com detecção de arbovírus em larvas, de forma sumarizada, para garantir a proteção da identidade de indivíduos arrolados no estudo. Os mapas permitirão compreender a distribuição espaço-temporal dos arbovírus, assim como identificar possíveis fatores relacionados a essa distribuição.

Local de realização da pesquisa (Na Unicamp): LEVE-IB-UNICAMP.

Desfecho Primário: Estima-se compreender os fatores ecoepidemiológicos e dos vetores e dos humanos, e sua relação com arbovírus emergentes e/ou reemergentes que circulam em Roraima.

Objetivo da Pesquisa:

Justificativa: As arboviroses são um grupo de vírus que representam problemas na sociedade atual em termos de saúde pública, estima-se que circulam ao redor do mundo aproximadamente 576 espécies de arbovírus sem que haja uma fonte de prevenção efetiva para a maioria dos vírus implicados (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). No Brasil, até o momento foram notificados 210 vírus transmitidos por artrópodes, sendo um dos países que abriga os maiores registros de circulação de arbovírus no mundo e por consequência um dos países que mais dispense e recursos no ocidente para seu combate e controle (CASSEB et al., 2013; TEICH; ARINELLI; FAHAM, 2017). Roraima é um dos estados abrangidos pela floresta Amazônica, onde circulam uma grande diversidade de arbovírus, causando graves problemas não só para população da zona urbana, mas também para população indígena dos arredores, acarretando sobrecarga no sistema de saúde pública e grandes perdas financeiras (ACOSTA et al., 2012; IBGE, 2020; TRINDADE et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2001). Esse grande número de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

arboviroses está relacionado a diversos fatores que sustentam a circulação desses vírus no estado, como: as condições ambientais que permitem a existência de uma ampla gama de vetores, somadas a vegetação que engloba não só a floresta Amazônica mas também as savanas e as zonas de transição entre biomas, essa característica peculiar chamada localmente de "Lavrado" está localizada ao norte da Amazônia Brasileira, região denominada "Savanas da Guiana" formando uma grade complexo que ocorre nas fronteiras do Brasil, Guiana e Venezuela. O clima, tipo de solo e flutuações nas dinâmicas das águas criam interações naturais nesse ambiente que promove rotas de dispersão e intercâmbio genético muito específico para esse ambiente amazônico (BARBOSA et al., 2007). Esses fatores, contribuem para que Roraima apresente-se como um estado hiperendêmico para arboviroses e propício para a detecção de novos arbovírus no país (BARBOSA; MIRANDA, 2005; CASSEB et al., 2013; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Além disso, outro problema que essa região vem enfrentando desde 2015 foi o aumento crescente do movimento migratório de venezuelanos para o Brasil pela fronteira com Roraima. A realidade dessa migração contempla desde circulação pendular, com sua entrada no Brasil e retornos constantes para a Venezuela, mantendo sua permanência no Estado o que facilita o seu retorno, assim como os que utilizam o Brasil como trânsito para outras localidades ou mesmo estabelecendo-se no território brasileiro, essa característica pode ser facilitadora para a introdução e dispersão de novos arbovírus (SILVA; JUBILUT, 2018).

Hipótese: O estado de Roraima representa importante porta de entrada para arbovírus emergentes e reemergentes, apresentando características ecoepidemiológicas diferentes daquelas observadas em outros estados brasileiros.

Objetivo primário: Estudar fatores ecoepidemiológicos relacionados a arbovírus de importância médica circulantes no Estado de Roraima.

Objetivos secundários: 1) Verificar a ocorrência de transmissão transovariana em larvas de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*; 2) Identificar arbovírus em mosquitos adultos naturalmente infectados no município de Boa Vista; 3) Investigar a presença de arbovírus dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* e família *Peribunyaviridae* (ex-Bunyaviridae) em amostras de pacientes com síndrome febril indiferenciada; 4) Pesquisar a presença de arbovírus em casos humanos atípicos, incluindo manifestações neurológicas e congênitas; 5) Caracterizar, por ferramentas moleculares, arbovírus presentes em amostras de pacientes comprovadamente infectados; 6) Verificar os efeitos da infecção por arbovírus durante a gestação e sobre o desenvolvimento de crianças nascidas de mães comprovadamente infectadas por arbovírus; 7) Analisar a distribuição espaço-temporal de casos de infecção por arbovírus no município de Boa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

Vista; e, 8) Inferir as dinâmicas filogeográficas e características filogenéticas de arbovírus epidêmicos no Estado de Roraima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informaram quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes da pesquisa que “Durante a execução do projeto há risco de constrangimento durante a coleta de material principalmente a coleta de mosquitos e ou larvas nas residências e risco diminuído de identificação, já que as amostras são provenientes de unidades de saúde, local onde já ocorre a coleta de exames para identificação da doença”. Os pesquisadores informaram quanto aos benefícios diretos previstos para os participantes da pesquisa que “Entre os benefícios estão a identificação do vírus causador de doença, a promoção de ações para combate de mosquitos vetores e indiretamente, o planejamento de ações para identificação e prevenção de arbovírus”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A EQUIPE DE PESQUISADORES citada na capa do projeto de pesquisa e na PB inclui FABIANA GRANJA (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, Professora Associada da Universidade Federal de Roraima – UFRR, Pesquisadora responsável, Co-orientadora), JOSE LUIZ PROENÇA MODENA (Graduado em bacharelado e licenciatura em Biologia, Professor de Virologia do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do IB-UNICAMP, Orientador), JULIA FORATO (Graduação em Ciências Biológicas, Mestranda no PPG em Genética e Biologia Molecular do IB-UNICAMP, Orientanda).

A pesquisa foi classificada na Grande Área 4 (Ciências da Saúde) e tem como título público “ESTUDO ECOEPIDEMIOLÓGICO DE ARBOVÍRUS EM UM ESTADO DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA”.

A pesquisa não foi classificada nas áreas temáticas especiais.

A Instituição proponente do protocolo é o Instituto de Biologia da UNICAMP

O CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ foi listada Instituição Coparticipante, assim como o Instituto de Biologia – Unicamp.

O cronograma proposto no projeto e prevê seis meses para conclusão da pesquisa (presumidamente apenas as etapas envolvendo o IB-UNICAMP).

O cronograma descrito na PB indica que a pesquisa foi iniciada em 01/06/2018 e será concluída em 31/12/2022, em cerca de 55 meses (presumidamente o cronograma completo, relativo ao

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

centro coordenador).

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 431.500,00 para despesas de custeio (Equipamentos, Material permanente e Material para rotina laboratorial) e que será bancado pelo MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO.

Foi apresentado o Regulamento de Biorrepositório para a pesquisa: O material biológico a ser armazenado será constituído de amostras de soro humano. Essas amostras serão armazenadas em freezer -80°C, localizado(a) no Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes/IB/UNICAMP, Departamento Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, e identificadas por código específico. O responsável pela guarda das amostras no IB é o pesquisador JoséLuis Proença Módena. O prazo de armazenamento das amostras será de 12 meses, após aprovação e chegada da amostra. Ao final do prazo de armazenamento previsto em(1(c)) ou estendido com autorização pelo CEP, o material biológico armazenado deverá ser descartado e destruído.

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc) detalhado como "dados coletados (dados de fichas de notificação, resultados de exames clínicos e laboratoriais e demais documentos) serão utilizados nesta pesquisa, sem informações pessoais ou que permitam a identificação dos participantes por pessoas externas ao projeto, ou por demais membros da equipe, com exceção dos investigadores principais. Tais dados serão suprimidos pelos órgãos públicos parceiros (LACEN-RR e CGVS) antes do fornecimento dos dados em forma de planilha eletrônica. Tal procedimento visa garantir a preservação da privacidade e a confidencialidade da identidade dos mesmos".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e blocos de informação utilizados para elaboração do parecer foram:

Registro do protocolo na Plataforma Brasil: Arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1909824.pdf" de 04/08/2022.

Carta resposta ao parecer: Arquivo "RespostaCOEPUNICAMP4.pdf" de 04/08/2022.

Projeto de pesquisa: Arquivo "Projeto_MestradoCEP_v3.pdf" de 04/08/2022.

Regulamento de biorrepositório: Arquivo "regulamento_de_biorrepositorio_JULIA_V2.pdf" de 04/08/2022.

Foram apresentados ainda 19 arquivos de versões anteriores do protocolo, que não foram avaliados para a elaboração deste parecer.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há mais pendência por resolver:

PENDÊNCIAS RELATIVAS AO PROJETO DE PESQUISA E AO REGISTRO DO PROTOCOLO NA PB:

Pendência (atendida em 28/06/2022)- A pendência "Cronograma Na PB não é claro qual fase será realizada na UNICAMP e sua respectiva data. No documento "Projeto_mestrado_Julia_Forato.pdf" as fases Envio das amostras para Campinas Extração do RNA das amostras Quantificação das amostras Realização de PCR em tempo real para ZIKV Realização de PCR em tempo real para DENV 1, 2, 3 e 4 Realização de PCR em tempo real para CHIKV Realização de PCR em tempo real para MAYV Realização de PCR em tempo real para OROV Montagem das bibliotecas JÁ FORAM REALIZADAS NOS 3 PRIMEIROS BIMESTRES DE 2022, encerrando este mês. Favor esclarecer e uniformizar documentos". Resposta em 28/06/2022: "Projeto de mestrado com as adequações do cronograma, aguardando a aprovação do CEP". A inspeção do arquivo do "projeto de pesquisa" informa que a pesquisa será realizada em 6 meses em sua etapa no IB-UNICAMP. O cronograma disposto na PB informa os prazos para o protocolo completo, incluindo as etapas na UNICAMP, e será concluído em 31/12/2022, o que é compatível com o cronograma descrito no projeto de pesquisa, ainda que tenham sido descritos de modo distinto.

PENDÊNCIAS RELATIVAS AOS DEMAIS DOCUMENTOS DO PROTOCOLO:

Pendência (atendida em 04/08/2022)- Quanto ao prazo de estocagem, os pesquisadores informaram que "Nessa nova resposta, uniformizamos todos os documentos como consta no Carta_anuencia_IB.pdf de 25/05/2022, dizendo que as amostras serão descartadas ao final do estudo e envio delas para o local de origem será feito apenas caso solicitado". No regulamento de biorrepositório os pesquisadores informaram que "c) O prazo de armazenamento do material biológico humano no Biorrepositório consta no cronograma do projeto ao qual o Biorrepositório está associado, e será de 12 meses (1 ano) após aprovação e chegada da amostra. Ao final do prazo de armazenamento previsto, o material biológico armazenado deverá ser descartado e destruído". No item 1, "c) O prazo de armazenamento do material biológico humano no Biorrepositório consta no cronograma do projeto ao qual o Biorrepositório está associado, e será de 12 meses (1 ano) após aprovação e chegada da amostra. Ao final do prazo de armazenamento previsto em(1(c)) ou estendido com autorização pelo CEP, o material biológico armazenado deverá ser descartado e destruído". O modelo ajustado do Regulamento de Biorrepositório foi apresentado em arquivo PDF.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.
- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1909824.pdf	04/08/2022 16:27:22		Aceito
Outros	Projeto_MestradoCEP_v3.pdf	04/08/2022 16:23:16	Fabiana Granja	Aceito
Outros	RespostaCOEPUNICAMP4.pdf	04/08/2022 16:22:42	Fabiana Granja	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	regulamento_de_biorrepositorio_JULIA_V2.pdf	04/08/2022 16:18:44	Fabiana Granja	Aceito
Outros	Resposta_COEP_UNICAMP_3.pdf	28/06/2022 16:32:22	Fabiana Granja	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_julia.pdf	28/06/2022 16:28:20	Fabiana Granja	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	regulamento_de_biorrepositorio_versao_cepunicamp_Labmol.pdf	28/06/2022 16:27:03	Fabiana Granja	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Recurso_Unicamp_2.pdf	25/05/2022 15:48:53	Fabiana Granja	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_IB.pdf	25/05/2022 15:40:34	Fabiana Granja	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_LEVE.pdf	25/05/2022 15:40:00	Fabiana Granja	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Julia_Forato.pdf	25/05/2022 15:39:40	Fabiana Granja	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_modena.pdf	25/05/2022 15:39:18	Fabiana Granja	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_CEP_UFRR.pdf	25/05/2022 15:38:58	Fabiana Granja	Aceito
Outros	Termo_de_acordo_cooperacao_LEVE_LaBMol.pdf	26/04/2022 16:41:57	Fabiana Granja	Aceito
Outros	Projeto_mestrado_Julia_Forato.pdf	26/04/2022 16:40:24	Fabiana Granja	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_CEP_UNICAMP.pdf	26/04/2022 16:39:12	Fabiana Granja	Aceito
Outros	Planilha_Publicacao_DOU_3893714196383573.pdf	15/08/2018 13:19:09	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_estudo_arbovirus.pdf	15/08/2018	ISMAEL	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br



Continuação do Parecer: 5.625.875

/ Brochura Investigador	Projeto_estudo_arbovirus.pdf	13:16:09	DA SILVA NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_arbovirus.pdf	13/07/2018 00:27:20	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_arbovirus.pdf	13/07/2018 00:26:57	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_arbovirus_gravidas.pdf	13/07/2018 00:25:57	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA NASCIMENTO	Aceito
Outros	TCUD.pdf	06/05/2018 22:34:51	ISMAEL ALEXANDRE DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_LACEN.pdf	02/05/2018 23:25:17	Fabiana Granja	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 05 de Setembro de 2022

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@unicamp.br

9.4. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Epidemiologia molecular de arbovírus em pacientes com síndrome febril em Roraima**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, de 23 abril de 2025

Assinatura :

Nome do(a) autor(a): **Julia Forato**

RG n.º 39.823.344-5

Assinatura :

Nome do(a) orientador(a): **José Luiz Proença Módena**

RG n.º 32.744.098-3