

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Ciências Biológicas

Alanis Silva Melgarejo

VIROMA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) SILVESTRES DA REGIÃO
NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Porto Alegre
2024

Alanis Silva Melgarejo

**VIROMA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE)
SILVESTRES DA REGIÃO NOROESTE DO RIO GRANDE
DO SUL, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Campos

Porto Alegre

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Silva Melgarejo, Alanis
VIROMA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) SILVESTRES
DA REGIÃO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL /
Alanis Silva Melgarejo. -- 2023.
67 f.
Orientador: Fabrício Souza Campos Souza Campos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Metagenômica. 2. Mosquitos. 3. Virologia. 4.
Viroma. 5. Vírus. I. Souza Campos, Fabrício Souza
Campos, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alanis Silva Melgarejo

VIROMA DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) SILVESTRES DA REGIÃO
NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharela em Ciências Biológicas do
Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Campos

Instituto de Biociências, Porto Alegre, 08 de Fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fabrício Souza Campos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Martha Oliveira Trindade
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste TCC e contribuíram para o sucesso deste trabalho. Em primeiro lugar, minha gratidão à minha família, em especial à minha mãe e meu pai, cujo apoio e esforço foram fundamentais para que eu alcançasse este momento significativo. Agradeço também ao meu amor, Lorenzo, por estar sempre ao meu lado, oferecendo seu apoio incondicional e acreditando em mim.

Às minhas amigas de infância, Larissa, Isadora e Karolayne, expresso minha gratidão pelo constante apoio ao longo de todos esses anos de amizade. Além disso, quero agradecer às minhas amigas da faculdade, Ana Victória e Maria Eduarda, por tornarem as aulas e a graduação mais fáceis e divertidas.

Não posso deixar de agradecer a todos os professores e colegas do laboratório de Virologia da UFRGS. Em particular, agradeço ao Nicolas por me introduzir ao mundo da virologia e dos mosquitos, bem como por toda a assistência oferecida. Agradeço também à minha amiga desde os primeiros dias da graduação e à melhor colega de laboratório, Francine, que sempre acreditou em mim e ofereceu apoio neste trabalho. Um agradecimento especial para Martha, Bruna, Nicole e Raissa, cuja ajuda, apoio e risadas foram fundamentais para essa caminhada. Expresso minha gratidão ao meu orientador, Fabrício, e os professores Ana Cláudia Franco e Paulo Roehe por acreditarem em mim e neste trabalho, mesmo diante de todas as adversidades. Suas orientações foram cruciais para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao Jader Cardoso por me aceitar como estagiária no CEVS, por ajudar na concepção deste trabalho e por oferecer todo o apoio necessário. E, por fim, a equipe do CEVS pela contribuição na coleta das amostras.

RESUMO

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) são vetores de várias arboviroses de importância em saúde pública e possuem uma ampla diversidade de Vírus Específicos de Insetos (ISVs). Porém, há necessidade de mais estudos para compreender e identificar a diversidade viral presente nestes insetos. Logo, a exploração do viroma por meio de metagenômica é fundamental para entender as interações entre vetores/hospedeiros e vírus. Nesse contexto, o presente projeto visa detectar vírus a partir de metagenômica de mosquitos silvestres coletados na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isso, 489 mosquitos de diferentes espécies foram coletados em Derrubadas e Santo Antônio das Missões com o apoio do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). Para este estudo, foi utilizado um *n* amostral de 90 indivíduos divididos entre as espécies de *Psorophora ferox* e *Culex* spp.. Os mosquitos foram identificados, agrupados em *pools* por espécie com até 30 indivíduos, seguidos de clarificação, filtragem e ultracentrifugação. Os ácidos nucleicos foram extraídos e, posteriormente, as amostras passaram por vários processos de amplificação e enriquecimento em reações com as polimerase *Taq* e *Klenow* utilizando primers K-random-s e K-s. O sequenciamento de alto desempenho foi realizado com Illumina Miseq no CDCT e gerou, em média, 342.782 *reads*, resultando na montagem de 787 *contigs*. Os *pools* apresentaram uma média de 82% de *reads* não classificados, 14% de *reads* bacterianas, 4% de *reads* de eucariotos e 1,5% de *reads* virais. No que tange às *reads* virais, aproximadamente 80% consistiam em sequências virais não caracterizadas, designadas como "matéria viral escura". Em todos os *pools*, foram identificadas famílias associadas à contaminação, sendo elas: *Retroviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Orthoherpesviridae* e *Poxviridae*. Além disso, observou-se uma notável abundância de bacteriófagos, frequentemente detectados em diversos estudos de metagenômica. A média de sequências virais identificadas entre os *pools* de mosquitos foi de 1,5%, abrangendo as seguintes famílias virais: *Dicistroviridae*, *Microviridae*, *Narnaviridae*, *Phenuiviridae*, *Hypoviridae*, *Mitoviridae*, *Nairoviridae*, *Pospiviroidae* e a Ordem *Reovirales*. Este estudo oferece informações valiosas sobre a diversidade viral em mosquitos, destacando tanto as oportunidades quanto as limitações da metagenômica nesse contexto. O esperado é que esta pesquisa possa servir como um ponto de partida para estudos adicionais e contribuir para a compreensão mais aprofundada das interações entre mosquitos e vírus.

Palavras-chave: Mosquitos; Viroma; Sequenciamento de Alto Desempenho

ABSTRACT

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are vectors of various arboviruses of public health importance and harbor a wide diversity of Insect-Specific Viruses (ISVs). However, there is a need for more studies to comprehend and identify the viral diversity present in these insects. Therefore, the exploration of the virome through metagenomics is crucial for understanding the interactions between vectors/hosts and viruses. In this context, the present project aims to detect viruses through metagenomics of wild mosquitoes collected in the northwest region of Rio Grande do Sul, Brazil. For this purpose, 489 mosquitoes of different species were collected in Derrubadas and Santo Antônio das Missões with the support of the Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). For this study, a sample size of 90 individuals was used, divided among the species *Psorophora ferox* and *Culex* spp. The mosquitoes were identified, grouped into species-specific pools of up to 30 individuals each, followed by clarification, filtration, and ultracentrifugation. Nucleic acids were extracted, and, subsequently, the samples underwent various processes of amplification and enrichment with both *Taq* and Klenow polymerases using K-random-s and K-s primers. High-throughput sequencing was performed with Illumina MiSeq at the CDCT, generating an average of 342,782 reads, resulting in the assembly of 787 contigs. The pools exhibited an average of 82% of unclassified reads, 14% bacterial reads, 4% eukaryotic reads, and 1.5% viral reads. Regarding viral reads, approximately 80% consisted of uncategorized viral sequences, referred to as "dark viral matter." In all pools, families associated with contamination were identified, namely: *Retroviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Orthoherpesviridae*, and *Poxviridae*. A notable abundance of bacteriophages, commonly detected in various metagenomic studies, was observed. The average of viral sequences related to mosquitoes identified among the pools was 1.5%, encompassing the following viral families: *Dicistroviridae*, *Microviridae*, *Narnaviridae*, *Phenuiviridae*, *Hypoviridae*, *Mitoviridae*, *Nairoviridae*, *Pospiviroidae*, and the Order *Reovirales*. This study provides valuable information about viral diversity in mosquitoes, enhancing knowledge about viral diversity in mosquitoes. It also highlights both the opportunities and limitations of metagenomics in this context. It is anticipated that this research can serve as a starting point for additional studies and contribute to a more in-depth understanding of the interactions between mosquitoes and viruses.

Keywords: Mosquitoes; Virome, High-throughput sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxonomia dos mosquitos de forma esquematizada.	15
Figura 2 – Ciclo de vida dos mosquitos envolvendo suas fases imaturas aquáticas (ovo, larva e pupa) e o mosquito adulto.	16
Figura 3 – Etapas que envolvem a transmissão de patógenos por mosquitos.	18
Figura 4 – Demonstração do ciclo de transmissão de arboviroses.	20
Figura 5 – Família <i>Flaviviridae</i> .	21
Figura 6 – Gênero <i>Alphavirus</i> .	22
Figura 7 – Família <i>Peribunyaviridae</i>	24
Figura 8 – Família <i>Reoviridae</i> .	25
Figura 9 – Família <i>Rhabdoviridae</i> .	26
Figura 10 - Mapa do Rio Grande do Sul com destaque para os pontos de coleta.	33
Figura 11 - Fluxograma esquemático com as principais etapas do processamento para Sequenciamento de Nova Geração.	36
Figura 12 - Alinhamento com a sequência <i>Army Ant microvirus 2</i> (GenBank: OP884053.1).	42
Figura 13 - Alinhamento com a sequência <i>Apis mellifera associated microvirus 2</i> (GenBank: MH992161.1)	42
Figura 14 - Alinhamento com a sequência <i>Trichosanthes kirilowii gokushovirus</i> (GenBank: MN862334.1).	43
Figura 15 - Alinhamento com a sequência Chaq virus-like 1 ORF1 (GenBank: KX148554.1).	43
Figura 16 - Alinhamento com a sequência <i>Aphis citricidus bunyavirus segment S</i> (Família <i>Phenuiviridae</i>) (GenBank: NC_078985.1).	43
Figura 17 - Alinhamento com a sequência Citrus exocortis viroid isolate Najaf (GenBank: OR024670.1) (Família <i>Pospiviroidae</i>).	44.
Figura 18 - Alinhamento com a sequência <i>High Island virus S3</i> (GenBank: MF094130.1) (Ordem <i>Reovirales</i>).	44
Figura 19 - Alinhamento com a sequência <i>Orthonairovirus haemorrhagiae segment M</i> (GenBank: OR047155.1) (Família <i>Nairoviridae</i> .	44
Figura 20 - Alinhamento com a sequência <i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus</i> (GenBank: MW454895.1) (Família <i>Mitoviridae</i>).	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Representação das reads pré e pós trimmagem, os contigs gerados e seus respectivos tamanhos referente a cada pool. 36
- Tabela 2 – Apresentação dos detalhes dos contigs de cada *pool*, juntamente com os resultados do BlastN correspondente a cada um. 40

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
1.1	Objetivo.....	12
1.2	Objetivos específicos.....	12
1.3	Justificativa.....	12
2	Referencial teórico.....	13
2.1	Taxonomia de Mosquitos (Culicidae).....	13
2.2	Biologia dos Mosquitos.....	15
2.3	Arboviroses.....	18
2.3.1	Flaviviridae.....	20
2.3.2	<i>Togaviridae</i>	21
2.3.3	Peribunyaviridae.....	23
2.3.5	<i>Rhabdoviridae</i>	26
2.4	Vírus Específicos de Insetos.....	27
2.5	Viroma.....	29
3	Metodologia.....	31
3.1	Coleta e Processamento de Mosquitos.....	31
3.2	Preparo dos <i>Pools</i> para Ultracentrifugação.....	33
3.3	Tratamento com nucleases e extração de ácidos nucleicos virais.....	34
3.4	Transcrição reversa para obtenção de DNA complementar (cDNA).....	34
3.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
3.6	Amplificação com Klenow.....	35
3.7	Amplificação final com o primer K-s.....	35
3.8	Sequenciamento e análise dos dados.....	35
4	Resultados.....	36
5	Discussão.....	46

Conclusão.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICE A.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos dípteros pertencentes à Família Culicidae (Harbach et al., 2015). Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e, na grande maioria das espécies, as fêmeas são hematófagas, enquanto as fases imaturas são aquáticas (Consoli; Oliveira, 1994). Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (Hawkes *et al.*, 2022).

Os mosquitos são encontrados em diversos ambientes, o que contribui para uma ampla distribuição geográfica e proliferação em diferentes regiões do mundo (Andrew Stevenson Joel Chandranesan, 2023). Os mosquitos silvestres são aqueles que geralmente se desenvolvem e vivem em ambientes naturais, longe das áreas urbanizadas, e são encontrados principalmente em áreas florestais, pântanos e zonas rurais. Já os mosquitos urbanos são adaptados às áreas altamente antropizadas e se beneficiam das atividades humanas. Seus habitats incluem áreas residenciais, industriais, áreas com lixo acumulados e com águas paradas (CDC, 2023).

Durante muitos anos, pensava-se que a única inconveniência desses insetos era o incômodo causado por sua picada. Porém, no final do século XIX, se descobriu que a filariose bancroftiana e a malária, doenças causadas por parasitas, eram transmitidas pelos mosquitos (Consoli; Oliveira, 1994). Com a evidência de que os mosquitos também desempenham um papel na transmissão de vírus, como o vírus da febre amarela (YFV) (Hubálek; Rudolf; Nowotny, 2014) e o vírus da dengue (DENV) (Abduljalil; Abd Al Galil, 2022), os mosquitos receberam ainda mais atenção dos pesquisadores de várias partes do mundo.

Ao realizar pesquisas abrangentes sobre os mosquitos e seus vírus associados, é possível não apenas monitorar a presença e a distribuição das espécies de vetores, mas também identificar novos patógenos com potencial para transmissão a seres humanos e outros animais (Andrew Stevenson Joel Chandranesan, 2023). Tais descobertas são de vital importância para entender a rica diversidade viral presente nos mosquitos e a complexa dinâmica de transmissão desses patógenos (Atoni *et al.*, 2018). Além disso, a exploração do viroma por meio da metagenômica e do uso do sequenciamento de alto desempenho têm se destacado como ferramentas fundamentais para desvendar as interações entre os vetores, os vírus e seus hospedeiros (Nooij *et al.*, 2018). Consequentemente, o

presente projeto visa detectar novos vírus utilizando ferramentas de metagenômica de mosquitos (Diptera: Culicidae) silvestres coletados na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste projeto é investigar o viroma de mosquitos silvestres coletados na região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar a diversidade viral presente no viroma dos mosquitos;
- Identificar as principais famílias virais presentes no viroma dos mosquitos silvestres.

1.3 JUSTIFICATIVA

O presente projeto visa contribuir para a identificação de famílias virais por meio de ferramentas de metagenômica e sequenciamento de alto desempenho em mosquitos (Diptera: Culicidae) silvestres. Esses dados não só ampliarão nosso conhecimento sobre a rica diversidade viral presente nos mosquitos, como são fundamentais para desvendar as interações complexas entre os mosquitos vetores, os vírus que carregam e os hospedeiros envolvidos nesse ciclo biológico.

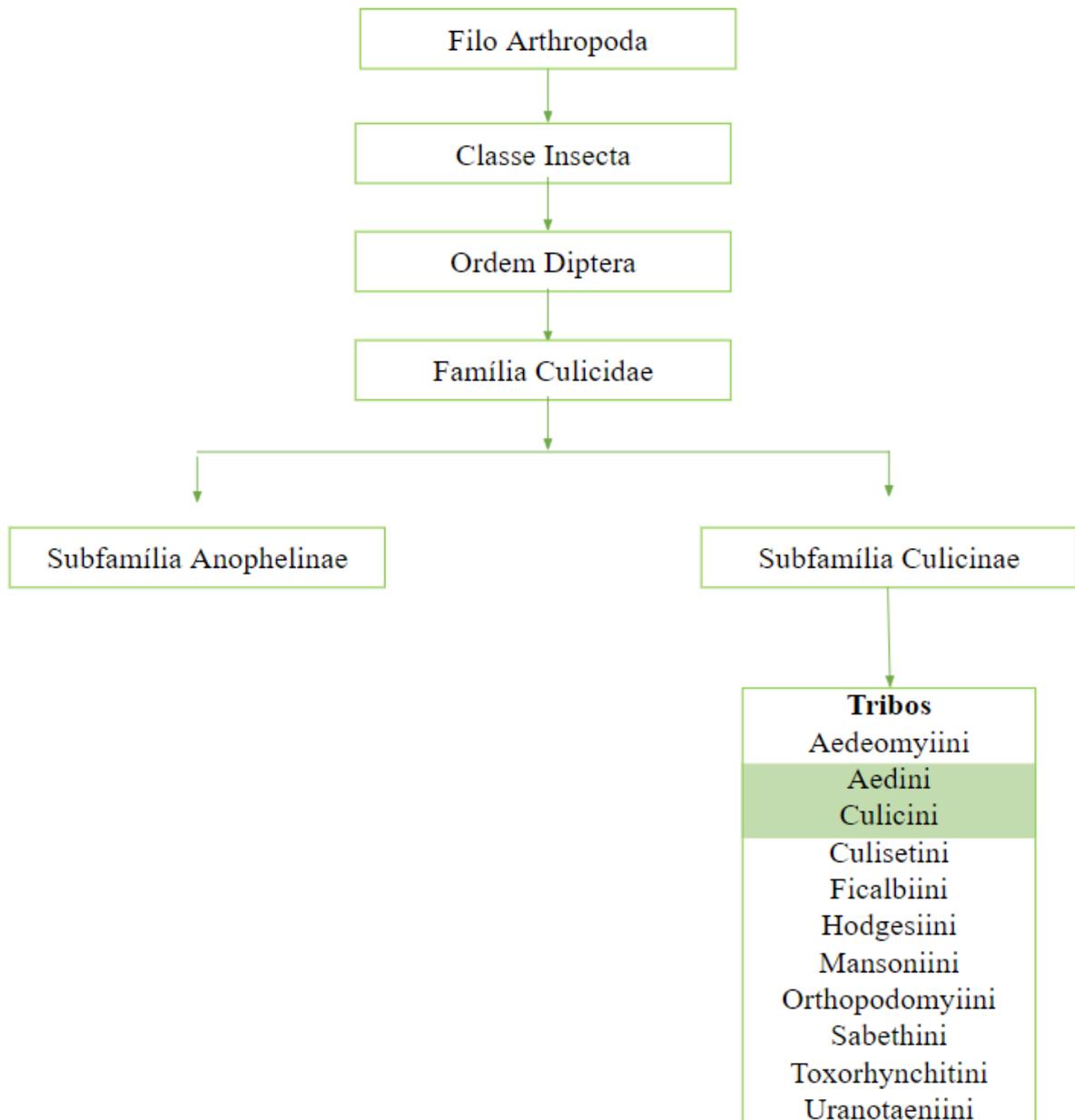
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TAXONOMIA DE MOSQUITOS (CULICIDAE)

Os mosquitos pertencem à família Culicidae, ordem Diptera, classe Insecta e filo Arthropoda (Rueda; Ddebboun, 2020). A família Culicidae, cuja etimologia deriva de *Culex*, o nome latino para "mosquito", representa um dos principais grupos e difere-se por sua longa probóscide, sendo considerado o mais especializado entre os aparelhos bucais perfuradores, indicando uma associação longa e próxima dos mosquitos com animais vertebrados (Foster; Walker, 2019).

A família Culicidae revela-se abundante e diversificada, distribuindo-se em regiões temperadas e tropicais em escala global, estendendo-se consideravelmente além do Círculo Ártico. A família engloba 3.719 espécies, classificadas em duas subfamílias, e cerca de 110 gêneros (Mosquito Taxonomy Inventory, 2023). A família Culicidae é considerada monofilética, embora as relações mais profundas permaneçam, em grande medida, não resolvidas (HARBACH, 2007). A subfamília Anophelinae representa uma linhagem monofilética basal em relação a todas as outras Culicidae e consiste em três gêneros distintos, sendo eles: *Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia* (Foster; Walker, 2019). A subfamília Culicinae abrange 37 gêneros, organizados em 11 tribos específicas, nomeadamente: Aedeomyiini, Aedini, Culicini, Culisetini, Ficalbiini, Hodgesiini, Mansoniini, Orthopodomyiini, Sabethini, Toxorhynchitini e Uranotaeniini (Mosquito Taxonomy Inventory, 2008).

Figura 1 – Taxonomia dos mosquitos de forma esquematizada.



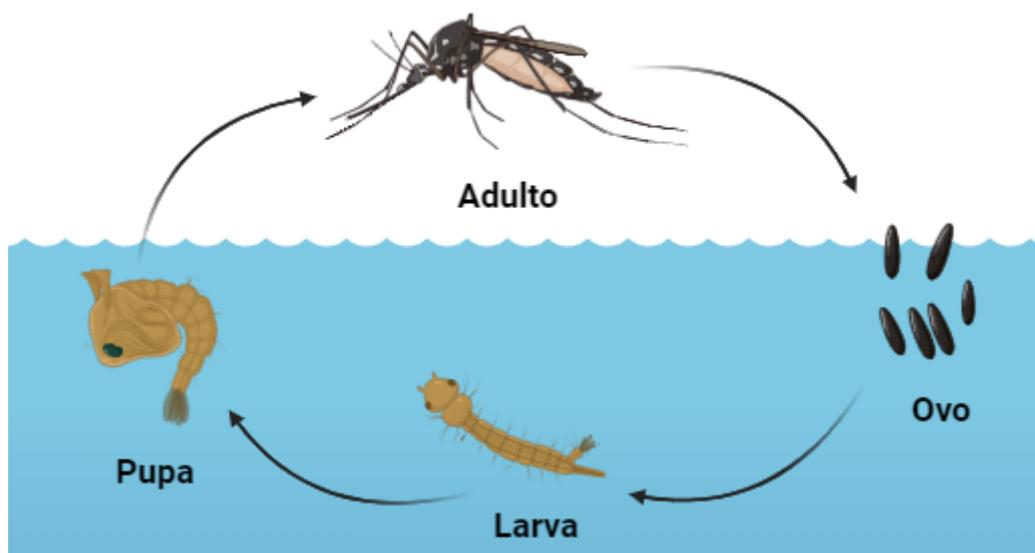
Fonte: O próprio autor.

A tribo Aedini é notável por sua amplitude, abrangendo 1.296 espécies classificadas em 11 gêneros distintos, a saber: *Aedes*, *Armigeres*, *Eretmapodites*, *Haemagogus*, *Heizmannia*, *Opifex*, *Psorophora*, *Udaya*, *Verrallina* e *Zeugomyia* (Mosquito Taxonomy Inventory, 2015). Outra tribo amplamente reconhecida é a Culicini, que inclui 789 espécies distribuídas em 4 gêneros distintos: *Culex*, *Deinocerites*, *Galindomya* e *Lutzia* (Rueda; Debboun, 2020).

2.2 BIOLOGIA DOS MOSQUITOS

Os mosquitos são insetos holometábolos, o que significa que passam por uma metamorfose completa, desde a eclosão dos ovos até as fases de larva e, subsequentemente, para uma fase pupal, da qual finalmente emergem como mosquitos adultos (Hawkes; Hopkins, 2021). Dado que as fases juvenis dos mosquitos são aquáticas, é imperativo que os ovos sejam depositados na água ou em proximidade a ela, podendo desenvolver-se em uma ampla variedade de habitats aquáticos. Entre estes habitats incluem-se águas superficiais temporárias (por exemplo, poças de maré em áreas de pântano salgado, poças de chuva e água de inundação), águas superficiais permanentes (por exemplo, poças, riachos, pântanos e lagos), além de diversos recipientes naturais e artificiais que retêm água (como buracos de árvores, bromélias, cascas de frutas, conchas de moluscos, potes de água e pneus descartados) (Foster; Walker, 2019). A seleção do local pela fêmea para a postura dos ovos é um fator crítico na determinação da sobrevivência da prole durante as fases imaturas (ovos, larvas e pupas) (Hawkes; Hopkins, 2021).

Figura 2 –Ciclo de vida dos mosquitos. Os mosquitos passam por uma metamorfose completa, atravessando fases imaturas aquáticas, que incluem ovo, larva e pupa, até emergirem como mosquitos adultos.



Fonte: O próprio autor.

Os mosquitos adultos, assim como outros artrópodes, são bilateralmente simétricos. São revestidos por um exoesqueleto e apresentam três regiões distintas

no corpo: cabeça, tórax e abdômen (Consoli; Oliveira, 1994). A cabeça tem forma oval, com dois grandes olhos compostos e cinco apêndices: duas antenas, dois palpos maxilares e a probóscide. O tórax possui três segmentos: o prótórax, o mesotórax e o metatórax. Cada segmento possui um par de pernas articuladas; o mesotórax apresenta ainda um par de asas funcionais e o metatórax, um par de estruturas nodosas chamadas de halteres. O abdômen é composto por 10 segmentos, dos quais os três terminais são especializados para reprodução e excreção (Rueda; Debboun, 2020).

A decomposição de matéria orgânica, na forma de detritos de plantas e invertebrados em decomposição, representa o principal componente da dieta das larvas de mosquito. A quantidade e a qualidade dos nutrientes disponíveis para as larvas estão diretamente ligadas ao desenvolvimento ótimo dos mosquitos adultos, tornando-os mais robustos e aumentando sua suscetibilidade à infecção e transmissão de vírus. Adicionalmente, é importante salientar que a alimentação larval pode estar diretamente associada à aquisição de vírus, uma vez que tais patógenos podem estar presentes nos detritos de plantas, invertebrados e até mesmo na própria água, que pode ser portadora de contaminação (Kain *et al.*, 2022).

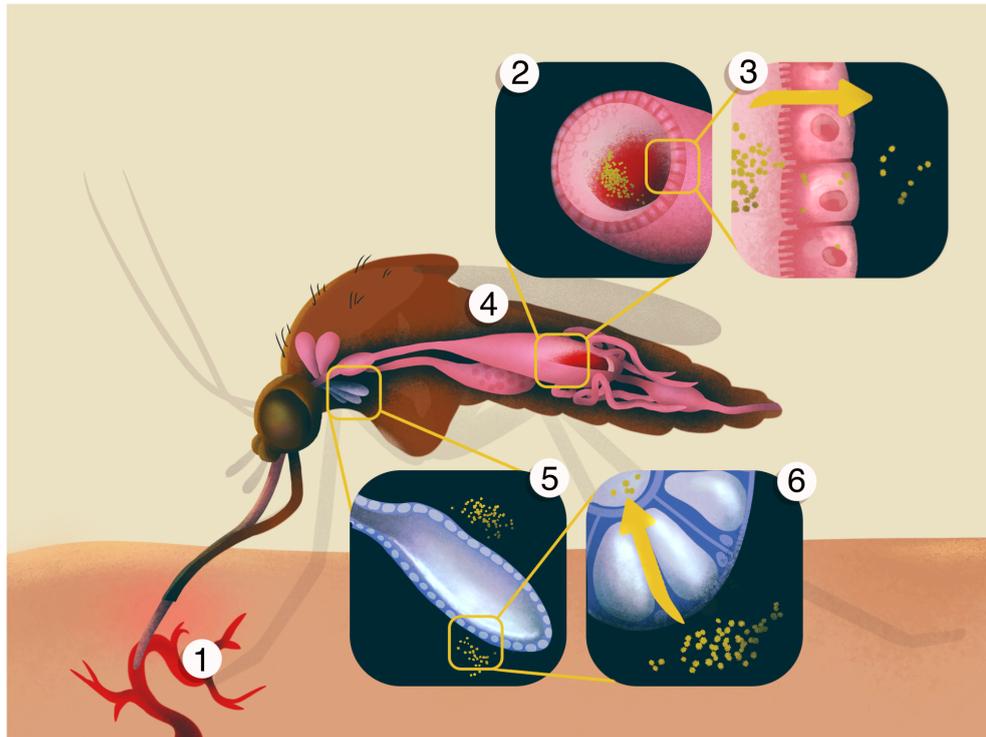
A alimentação dos mosquitos adultos consiste basicamente em fontes de açúcares de origem vegetal, como aqueles encontrados no néctar e sucos de frutas, tais hábitos tornam os mosquitos importantes polinizadores. O açúcar natural é consumido repetidamente ao longo da vida adulta por ambos os sexos e é de extrema importância para gerar energia suficiente para a maturação sexual, para o voo necessário ao acasalamento, à dispersão e, no caso das fêmeas, à busca por sangue de vertebrados (Hawkes; Hopkins, 2021).

Na maioria dos mosquitos, a ingestão e a digestão de uma refeição de sangue iniciam o desenvolvimento dos ovos ao estimular uma cascata de hormônios provenientes do cérebro e ovários. A grande quantidade de proteína contida na hemoglobina e no soro sanguíneo fornece os aminoácidos para a síntese de vitelogenina, o precursor proteico da gema do ovo. A proteína também serve como substrato para a construção de lipídios e glicogênio, que contribuem tanto para a gema do ovo quanto para as reservas de energia maternas usadas para sobrevivência e voo (Foster; Walker, 2019).

Os mosquitos que se alimentam preferencialmente de humanos são chamados de antropofílicos, porém o hábito alimentar pode variar entre os mosquitos, com espécies que se alimentam preferencialmente de outros grupos de mamíferos, aves, répteis, anfíbios ou peixes. Durante a alimentação de sangue, há o potencial para a transmissão de patógenos, incluindo vírus, filárias e protozoários (Mosquito Taxonomy Inventory, 2008).

De modo geral, ao alimentar-se de um hospedeiro infectado, o mosquito pode se contaminar com patógenos que circulam no sangue do hospedeiro. Posteriormente, os patógenos estabelecem uma infecção nas células epiteliais do intestino, superando as barreiras físicas e imunológicas do epitélio, e, em seguida, se espalham na hemocele do mosquito. Depois, os patógenos infectam outros tecidos, como glândulas salivares, ovários e sistema neural. Dessa forma, o mosquito infectado torna-se um vetor competente para transmissão para novos hospedeiros através da alimentação sanguínea (Wu *et al.*, 2019), ou seja, tornam-se organismos capazes de transmitir patógenos infecciosos entre humanos ou de outros animais para humanos (World Health Organization, 2020).

Figura 3 – Etapas que envolvem a transmissão de patógenos por mosquitos. 1) O vírus é ingerido juntamente com a refeição sanguínea de um hospedeiro infectado. 2) A refeição sanguínea infecciosa é depositada no intestino médio. 3) O vírus infecta e se replica nas células epiteliais do intestino. 4) O vírus se dissemina a partir das células epiteliais via hemolinfa e infecta outros tecidos. 5) O vírus, em seguida, infecta as células das glândulas salivares. 6) O vírus é então liberado na saliva quando o mosquito perfura outro hospedeiro vertebrado.



fonte: (Kain *et al.*, 2022)

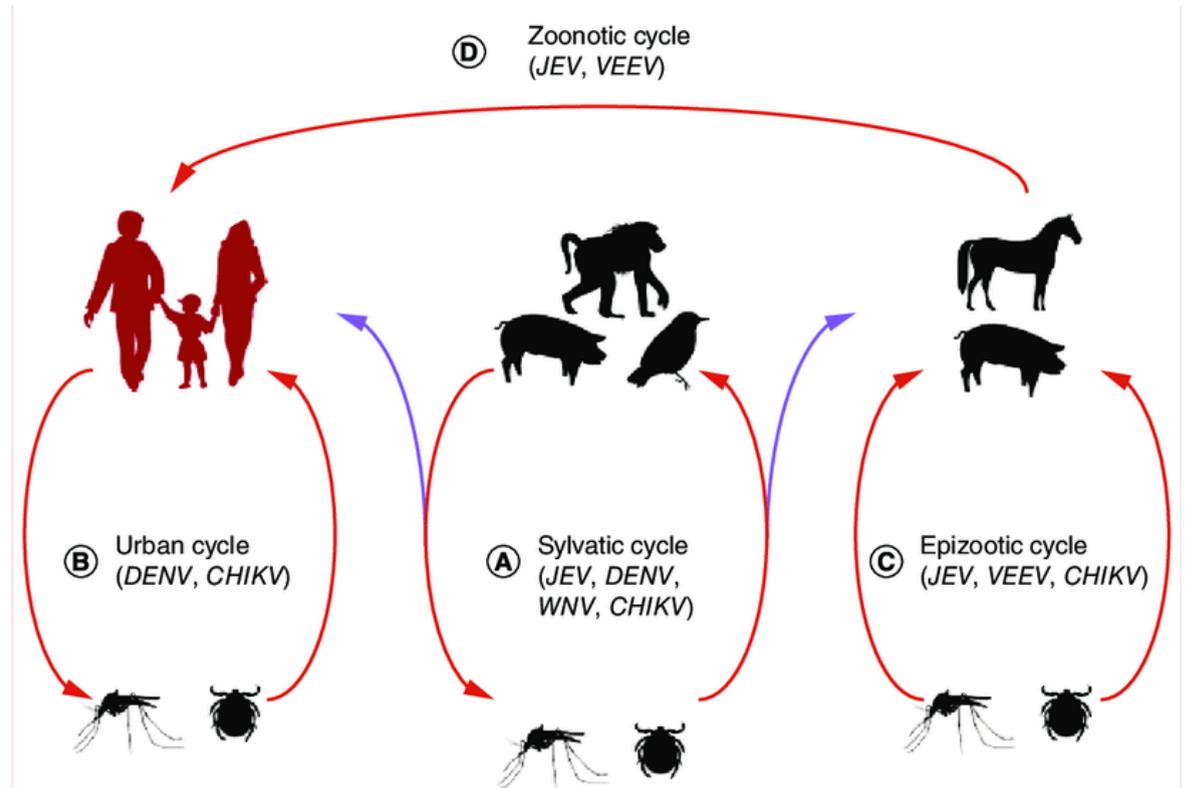
2.3 ARBOVIROSES

As doenças virais transmitidas por mosquitos são denominadas "arboviroses". A palavra "arbovírus" (do inglês **arthropod-borne-viruses**) é utilizada para descrever um grupo de vírus que são mantidos na natureza através de transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por artrópodes hematófagos (Wu *et al.*, 2019). As arboviroses podem ser encontrados em todo o mundo, sendo mais comuns em climas tropicais do que em climas temperados e estão relacionadas diretamente a fatores como dispersão rápida e geograficamente mais extensiva dos vírus e dos vetores em razão do crescimento intensivo dos sistemas de transporte globais, adaptação dos vetores a urbanização crescente, incapacidade de conter as populações de mosquitos e alterações em fatores ambientais (Van Leur *et al.*, 2021; World Health Organization, 2020).

Existem aproximadamente 500 arbovírus conhecidos, dos quais cerca de 100 são capazes de causar doenças em seres humanos e 40 em animais domésticos (Artsob; Lindsay; Drebot, 2017). Os mosquitos e carrapatos são os vetores mais importantes dos arbovírus, mas também podem ser transmitidos por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e mosquitos-pólvora (Diptera: Ceratopogonidae) (Hubálek; Rudolf; Nowotny, 2014).

A maioria dos vírus transmitidos por mosquitos que infectam humanos pertencem às famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Hubálek; Rudolf; Nowotny, 2014). Os vírus dessas famílias são causadores de uma ampla gama de doenças, desde febres hemorrágicas até infecções neurológicas (Artsob; Lindsay; Drebot, 2017). Além disso, infectam populações humanas e animais em padrões que variam de infecções esporádicas a grandes pandemias, podendo levar inclusive a perdas econômicas significativas para a sociedade, assim como altas morbidades e mortalidades entre os seres humanos e outros grupos de animais (Hubálek; Rudolf; Nowotny, 2014; Mosquito Taxonomy Inventory, 2008). A compreensão da diversidade desses vírus dentro dessas famílias é essencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, controle e tratamento eficazes, visando mitigar os impactos dessas doenças na saúde pública.

Figura 4 – Demonstração do ciclo de transmissão de arboviroses. A) O ciclo selvagem dos arbovírus ocorre em ambientes naturais, envolvendo animais selvagens como reservatórios principais e mosquitos, assim como, ocasionalmente, seres humanos como vetores. Os mosquitos picam animais selvagens infectados, adquirindo o vírus, e podem transmiti-lo ao picar outros animais selvagens ou seres humanos. B) O ciclo urbano das arboviroses ocorre principalmente em ambientes urbanos. Humanos são os principais reservatórios dos vírus e a transmissão ocorre quando mosquitos infectados picam pessoas, e o vírus se replica no corpo humano, causando doenças. Pessoas infectadas podem servir como fontes contínuas de infecção para mosquitos, perpetuando o ciclo. C) Uma epizootia de arbovirose refere-se a um aumento significativo e incomum de casos de doenças transmitidas por arbovírus entre os animais, resultando em alta morbidade e mortalidade entre os animais, bem como na disseminação da doença em uma determinada área geográfica. D) O ciclo zoonótico das arboviroses envolve a transmissão de arbovírus entre animais e seres humanos através da picada de mosquitos. Os animais não humanos atuam como reservatórios dos vírus, e os mosquitos transmitem o vírus quando picam esses animais e, subsequentemente, seres humanos.



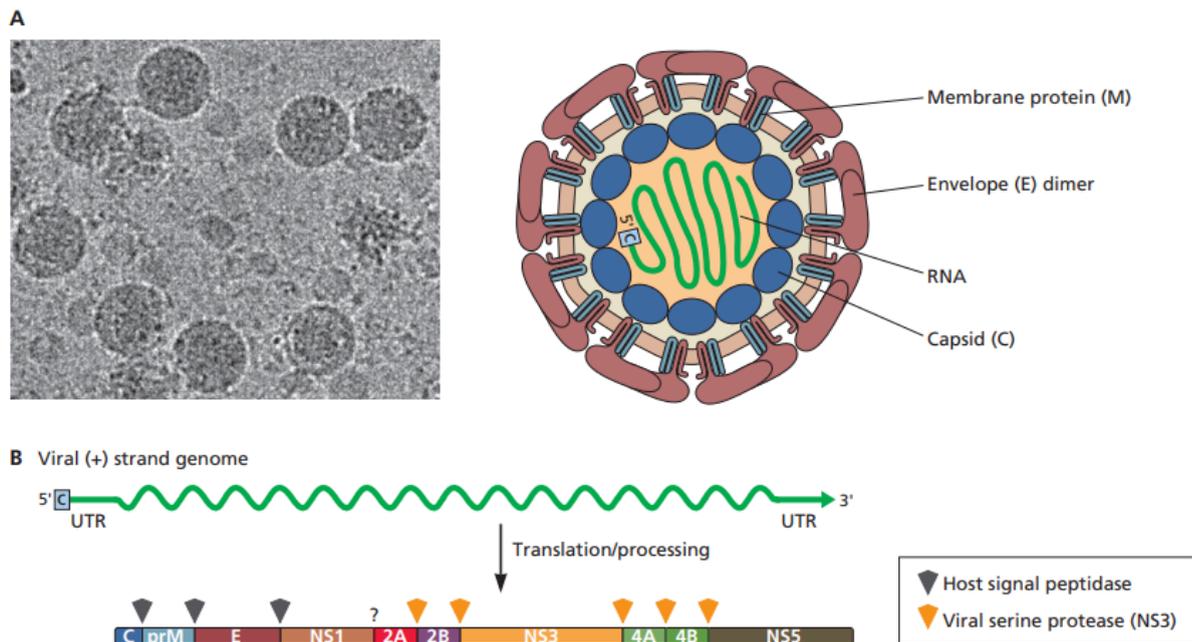
Fonte: Ong; Lum; Ng, 2014

2.3.1 FLAVIVIRIDAE

A família *Flaviviridae* é composta por 4 gêneros, incluindo o gênero *Orthoflavivirus*, que abrange 70 vírus com distribuição mundial, sendo 53 deles transmitidos por mosquitos (Artsob; Lindsay; Drebot, 2017). Os vírions dessa família têm formato esféricos com cerca de 50 nanômetros (nm) de diâmetro. O genoma viral é composto por um RNA de fita simples de polaridade positiva e possui um tamanho de 9,2 a 11,0 kilobases (kb). O RNA genômico é convertido em RNA mensageiro viral em células infectadas, dando origem às proteínas estruturais (Capsídeo, Envelope e Proteína de Membrana) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) necessárias para a montagem das partículas virais (Simmonds, *et al.*, 2017).

Figura 5 - Vírus da dengue, membro modelo da família *Flaviviridae*. A) À esquerda, imagem de crio-microscopia eletrônica de transmissão de partículas do vírus da dengue, um flavivírus de 50 nm de tamanho; à direita, desenho esquemática das partes de uma partícula do vírus da dengue B) Estrutura e organização do genoma. O RNA de fita simples polaridade positiva apresenta um cap na extremidade 5' e uma estrutura na forma de grampo na extremidade 3'. O genoma de RNA viral

contém regiões não codificantes 5' e 3' e codifica uma poliproteína que dá origem a proteínas estruturais virais (C, M, E) e proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).



Fonte: (Racaniello *et al.*, 2015)

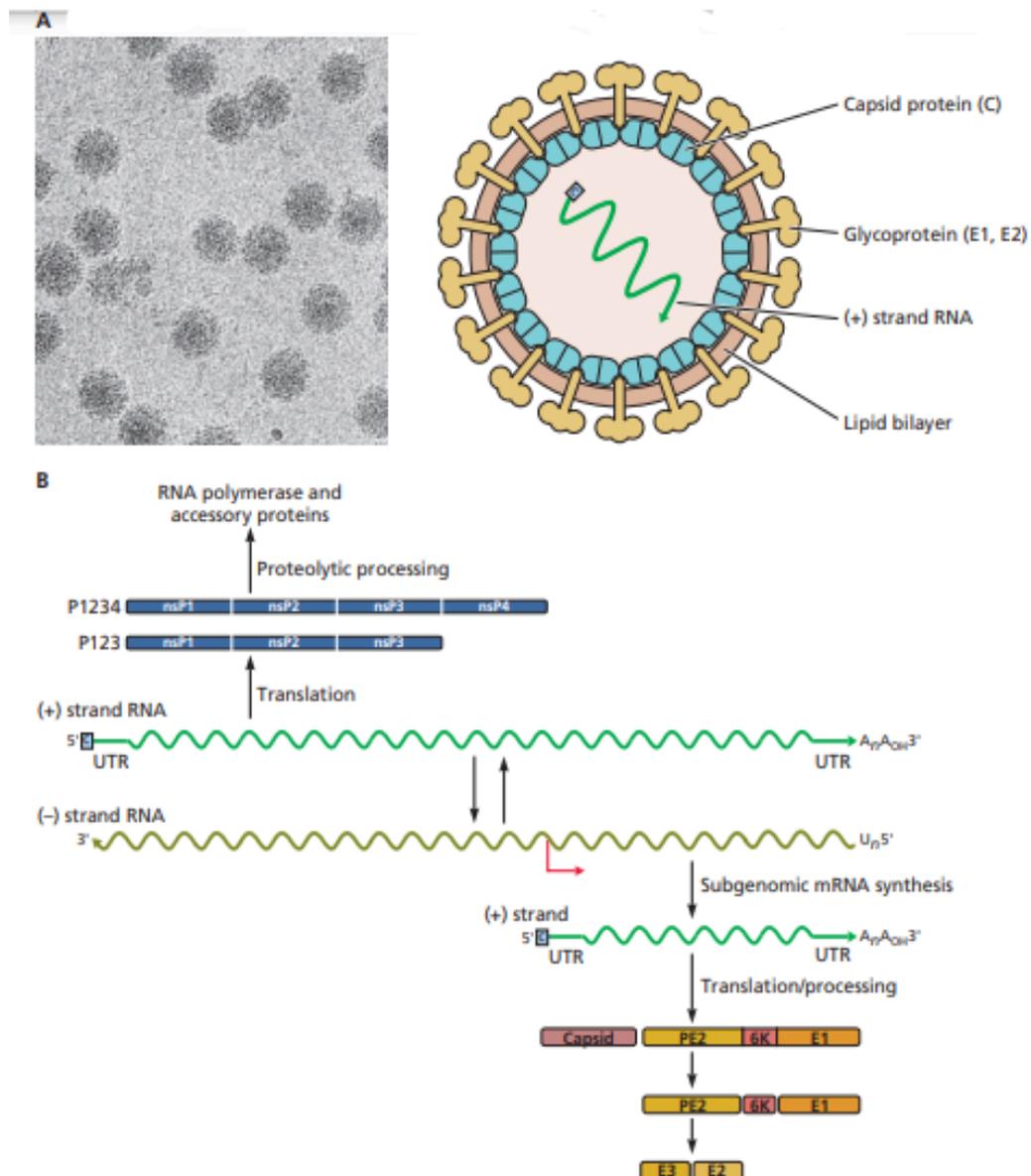
Patógenos humanos importantes desta família incluem YFV, DENV, vírus Zika (ZIKV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV), vírus da Encefalite do Nilo Ocidental (WNV), entre outros. Vale ressaltar que os membros da família também causam doenças economicamente importantes em animais domésticos e selvagens. Entre os principais hospedeiros silvestres destacam-se as aves e PNHs. Estes vírus podem produzir uma ampla variedade de sintomas, podendo ser categorizados em dois fenótipos distintos: doenças sistêmicas que envolvem hemorragias, como observado em DENV e YFV, e complicações neurológicas associadas a WNV e ZIKV (Van Leur *et al.*, 2021). Além disso, dentro da família também estão incluídos alguns Vírus Específicos de Insetos (ISV), que se multiplicam exclusivamente em células de insetos e não em células de vertebrados (Foster; Walker, 2019).

2.3.2 *Togaviridae*

A família *Togaviridae* abrange o único gênero *Alphavirus*, consistindo em 31 espécies distribuídas em todo o mundo (Artsob; Lindsay; Drebot, 2017). São vírions esféricos envelopados, com tamanho de 65-70 nm. Possuem genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva, com um tamanho variando de 9,7 a 11,8 kb. O genoma é composto por um cap na extremidade 5' (7-metilguanossina) e uma cauda

de poliA na extremidade 3', além dos genes que codificam as proteínas estruturais (Capsídeo, Glicoproteína E1 e Glicoproteína E2,) e não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) (Chen, *et al.*, 2018).

Figura 6 – Protótipo do gênero *Alphavirus*. A) Micrografia eletrônica e a estrutura do vírion. B) Os primeiros dois terços do RNA genômico do alfavírus, que é de polaridade negativa e tem um cap na extremidade 5', são traduzidos para produzir poliproteínas chamadas P123 e P1234, sendo esta última a precursora da RNA polimerase. As proteínas codificadas no terço final do genoma são produzidas a partir de um mRNA subgenômico que é uma cópia de um intermediário de RNA de fita positiva completa. Esse mRNA subgenômico codifica as proteínas estruturais.



Fonte: (Racaniello *et al.*, 2015)

O gênero *Alphavirus* consiste principalmente em vírus transmitidos por mosquitos, embora outros insetos hematófagos, incluindo carrapatos, piolhos e

percevejos, tenham sido implicados na transmissão de algumas espécies (Zaid *et al.*, 2021). Os hospedeiros vertebrados incluem humanos, PNHs, equinos, aves, anfíbios, répteis, roedores e suínos, porém algumas espécies também infectam mamíferos marinhos e peixes. Além disso, há espécies consideradas ISVs, que infectam apenas células de insetos e são incapazes de replicar em células de vertebrados (Chen, *et al.*, 2018).

As doenças mais importantes causadas por *Alphavirus* são as Encefalites Equinas, Chikungunya e Mayaro. As manifestações clínicas geralmente incluem encefalites, doenças febris e, frequentemente, dores nas articulações (Zaid *et al.*, 2021).

2.3.3 PERIBUNYAVIRIDAE

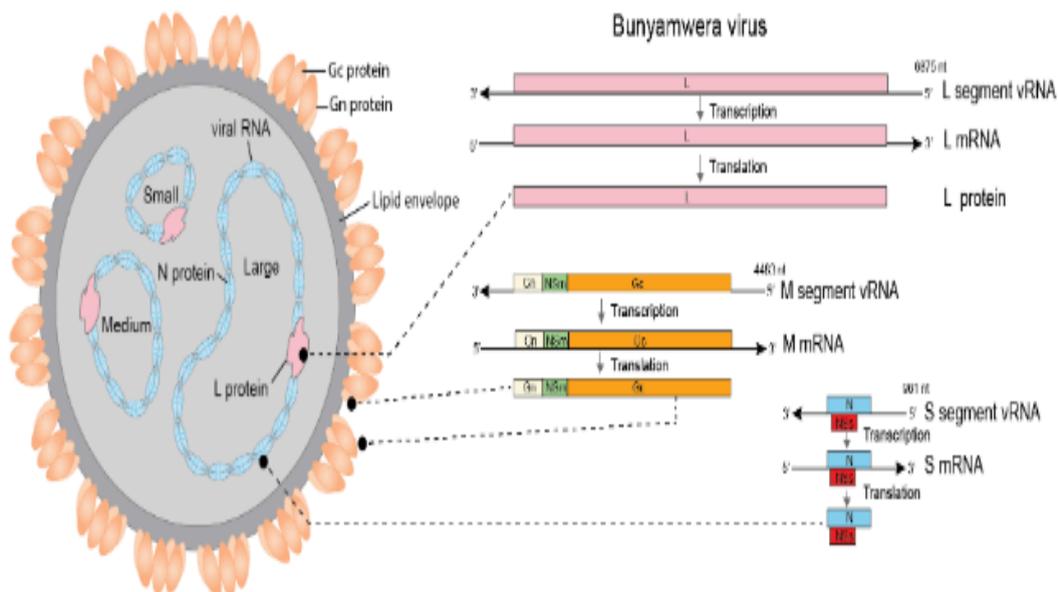
A família *Peribunyaviridae* constitui a maior família de vírus com mais de 300 espécies virais em sete gêneros (Hughes *et al.*, 2020). Os vírions dessa família são esféricos com um diâmetro de 80 a 120 nm. O genoma é segmentado, compreendendo três moléculas de RNA fita simples de polaridade negativa, denominadas de S (small), M (medium) e L (large), com tamanhos aproximados de 1 kb, 4 kb e 6,8 kb, respectivamente. Esses segmentos codificam a proteína do nucleocapsídeo, as glicoproteínas de envelope e a proteína L, que desempenha a função de uma RNA polimerase viral (Hughes *et al.*, 2020).

O gênero *Orthobunyavirus* abriga um conjunto complexo e diversificado de mais de 50 espécies de vírus amplamente disseminadas em escala global. Mosquitos servem como vetores, enquanto pequenos mamíferos, ungulados ou aves desempenham o papel de hospedeiros vertebrados. Esses vírus causam uma ampla variedade de síndromes clínicas em seres humanos e animais infectados, incluindo doenças febris inespecíficas, encefalites e febres hemorrágicas, e muitas espécies são teratogênicas em animais de criação prenhes infectados. Logo, muitos desses vírus têm um impacto significativo na saúde devido a doenças em humanos e/ou animais.

Por sua vez, o gênero *Phlebovirus* engloba 37 vírus, a maioria dos quais é transmitida por flebotomíneos. Este gênero também inclui o relevante vírus da Febre do Vale do Rift (RVFV), transmitido por mosquitos na África, que geralmente se desenvolve em hospedeiros ruminantes, mas também pode afetar roedores, PNHs e

humanos (Foster; Walker, 2019). Outro notável exemplo de bunyavírus de relevância médica nas Américas compreende o vírus da Febre do Oropouche (OROV), que pode afetar PNHs e humanos (Horne; Vanlandingham, 2014).

Figura 7 – Protótipo da família *Peribunyaviridae*. À esquerda: Representação diagramática de um vírion de peribunyavirus em corte transversal. As projeções superficiais consistem em duas glicoproteínas denominadas Gn e Gc. Os três nucleocapsídeos helicoidais são circulares e consistem em um de cada um dos segmentos únicos de RNA de fita simples (L, grande; M, médio; S, pequeno) encapsulados pela proteína N e associados à proteína L. À direita: Organização do genoma, transcritos e proteínas do vírus Bunyamwera.

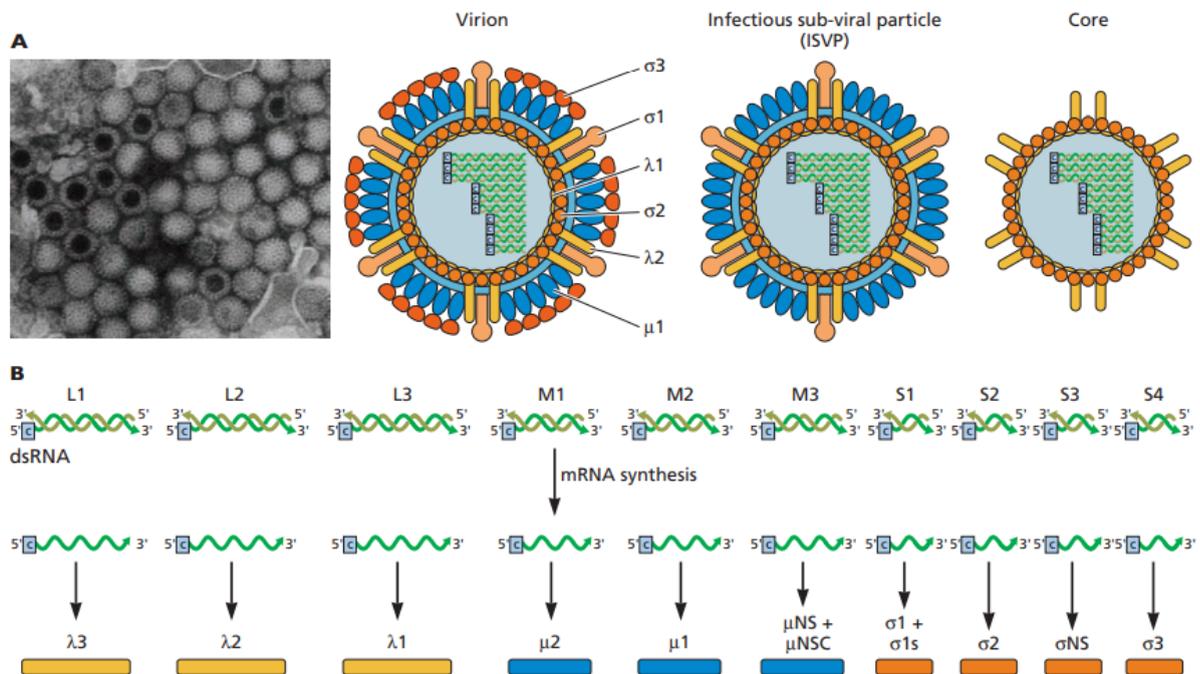


Fonte: (Racaniello *et al.*, 2015)

2.3.4 Reoviridae

A família *Reoviridae* é extensa e diversificada, compreendendo duas subfamílias e vários gêneros. Os membros da família *Reoviridae* possuem genomas segmentados de RNA dupla fita, com segmentos genômicos variando de 9 a 12 kb. A replicação dos reovírus é citoplasmática, e uma característica única desses vírus é que a transcrição ocorre de dentro dos capsídeos. Os vírions são não envelopados, apresentando duas ou três camadas de capsídeo (Andrew Stevenson Joel Chandranesan, 2023). Como grupo, os reovírus são muito bem-sucedidos, com uma ampla gama de hospedeiros que inclui fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (ICTV, 2011).

Figura 8 – Protótipo da família *Reoviridae*. (A) Micrografia eletrônica de partículas do reovírus coradas e esquemas da estrutura do vírion. As localizações de seis proteínas do vírion são indicadas na ilustração. B) O genoma de fita dupla compreende 10 segmentos, nomeados de acordo com o tamanho: grande (L1 a L3), médio (M1 a M3) e pequeno (S1 a S4).



Fonte: (Racaniello *et al.*, 2015)

O gênero *Coltivirus* possui um genoma de 12 segmentos e um tamanho variando entre 60 e 80 nm. Os coltívirus foram isolados de várias espécies de mamíferos (incluindo humanos), assim como de carrapatos e mosquitos que atuam como vetores artrópodes. Em humanos, a infecção é caracterizada por um início abrupto de febre, calafrios, dor de cabeça, dores retro-orbitais, fotofobia, mialgia e mal-estar generalizado. (ICTV,2011; Payne, 2017).

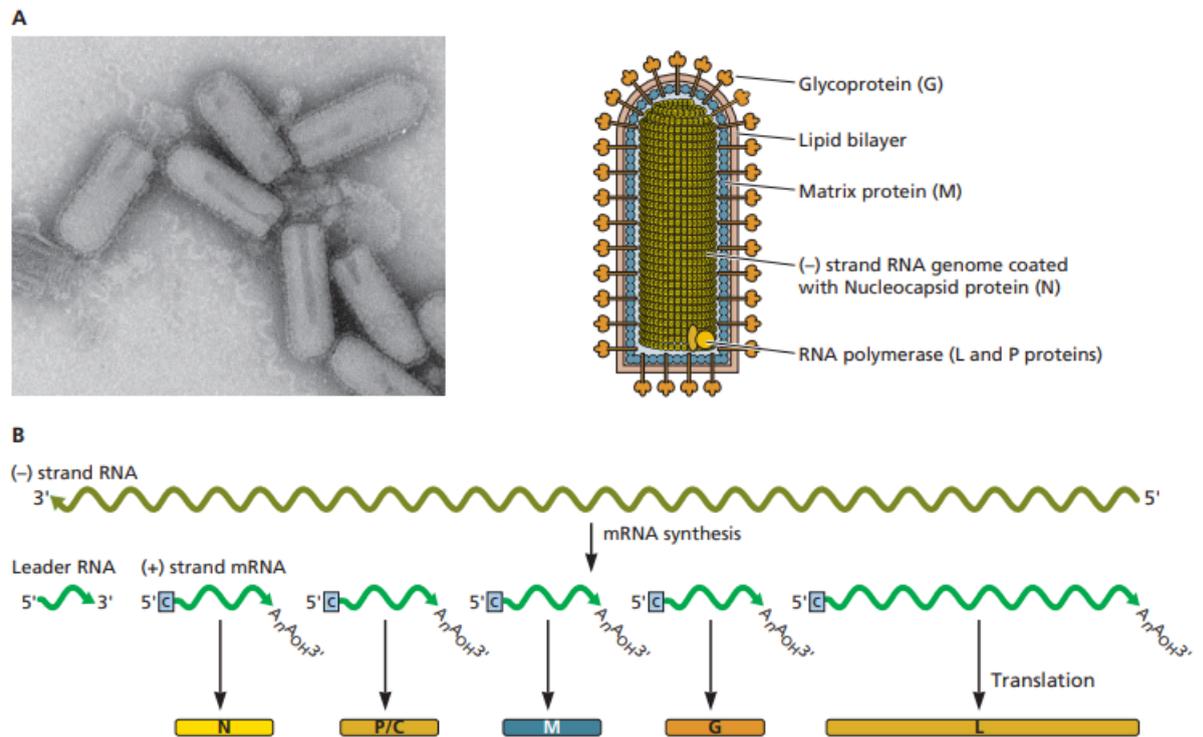
Um dos gêneros mais importantes da família *Reoviridae* é o *Orbivirus*. As partículas dos membros desse gênero possuem aproximadamente 90 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, e os genomas virais são compostos por 12

segmentos (ICTV, 2011). *Orbivirus* infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo ruminantes, equídeos, roedores, morcegos, marsupiais, aves, bichos-preguiça e PNHs, assim como humanos. Um dos vírus de importância veterinária mais relevantes é o Vírus da Língua Azul (BTV), distribuído globalmente, cujas infecções podem variar de assintomáticas a graves, gerando edema nos lábios, língua e cabeça, febre, depressão, secreção nasal, salivação excessiva, dor e morte, afetando principalmente ruminantes (Payne, 2017)

2.3.5 *Rhabdoviridae*

A família *Rhabdoviridae* compreende três subfamílias, 45 gêneros e 275 espécies de vírus. Os vírions são tipicamente envelopados e têm morfologia baciliforme. Os genomas virais são moléculas únicas de RNA de sentido negativo, de cadeia simples, com aproximadamente 10 a 16 kb e, geralmente, codificam 5 genes de proteínas estruturais (N, P, M, G e L) (Shahhosseini *et al.*, 2017). A família é ecologicamente diversa, com membros infectando plantas ou animais, incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios ou peixes. A família também é detectada em invertebrados, incluindo artrópodes, alguns dos quais podem atuar como hospedeiros únicos ou agir como vetores biológicos para a transmissão a outros animais ou plantas (Ryu, 2017).

Figura 9 – Protótipo da família *Rhabdoviridae*. A) Vírion da estomatite vesicular em micrografia eletrônica à esquerda e esquema da estrutura da partícula viral à direita. B) O RNA de fita negativa serve como modelo para a síntese do RNA líder e de cinco mRNAs monocistrônicos (com cap na extremidade 5' e cauda de poli A na extremidade 3').



Fonte: (Racaniello *et al.*, 2015)

Na subfamília *Alfarhabdovirinae* há alguns gêneros isolados e detectados apenas em mosquitos, sem nenhuma evidência de adaptação em vertebrados, sendo eles: *Almendravirus*, *Ohlsrhavirus*, *Mousrhavirus* e *Merhavirus*. Outros gêneros também foram isolados e detectados em mosquitos, porém possuem evidências de infecção em outras espécies de vertebrados, como humanos, roedores, aves, ruminantes, marsupiais e mamíferos, sendo eles: *Arurhavirus*, *Barhavirus*, *Curiovirus*, *Ephemerovirus* e *Hapavirus* (Walker *et al.* 2022). Na subfamília *Betarhabdovirinae* há seis gêneros de vírus que infectam plantas e são transmitidos por vetores artrópodes, sendo eles: *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Dichorhavirus*, *Gammanucleorhabdovirus* e *Varicosavirus* (Walker *et al.* 2022).

2.4 VÍRUS ESPECÍFICOS DE INSETOS

Mosquitos, além de possuírem uma ampla diversidade de arbovírus, também possuem em abundância os ISVs não patogênicos (Öhlund; Lundén; Blomstrom, 2019). Os ISVs têm sido descobertos através de trabalhos de vigilância de

mosquitos para vírus patogênicos e emergentes, mostrando a importância da vigilância ambiental para o estudo e identificação de novos vírus.

Os ISVs são um grupo diversificado, incluindo vírus que infectam naturalmente mosquitos e flebótomos e se replicam nesses insetos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mas a característica marcante é a incapacidade de se replicar em vertebrados (Öhlund; Lundén; Blomstrom, 2019). Essa restrição de hospedeiros dos ISVs pode ocorrer em diferentes níveis do ciclo de replicação, devido à interação entre fatores do hospedeiro, do vírus e do ambiente (Elrefaey *et al.*, 2020). Por exemplo, a presença de genes estruturais incompletos poderia causar a restrição do hospedeiro para alguns ISVs. O alinhamento de sequência da proteína de envelope de vários ISVs e flavivírus que infectam outros hospedeiros mostrou a falta de uma sequência de 8 resíduos no Domínio III dos ISVs, enquanto ela é conservada nos flavivírus que infectam outros hospedeiros. Isso pode implicar no impedimento da internalização da partícula do vírus, uma vez que essa é a função do domínio III da proteína de envelope (Elrefaey *et al.*, 2020; Carvalho; Long, 2021).

A prevalência de ISVs em mosquitos pode estar associada a diferentes tipos de modos de transmissão, mantendo esses vírus em populações de vetores. O principal mecanismo de transmissão usado pelos ISVs é a transmissão vertical, que é a transmissão das fêmeas para sua prole, uma vez que os ISVs foram detectados em todas as quatro fases do ciclo de vida do mosquito. ISVs e arbovírus usam a transmissão vertical para sua manutenção na natureza, incluindo dois mecanismos: a transmissão transovariana, por meio da qual os vírus infectam os tecidos germinativos das fêmeas de mosquito, e a transmissão transovular, pelo qual os ovos são infectados pelo vírus durante sua passagem pelo oviduto (Carvalho; Long, 2021; Patterson *et al.*, 2020).

Com os avanços nas ferramentas moleculares para detecção viral e também o crescente interesse no microbioma dos mosquitos, houve uma explosão recente na detecção e descrição de novos ISVs. A maioria foi provisoriamente colocada dentro da família *Flaviviridae* com base em análises filogenéticas, mas também já foram documentados vírus específicos de insetos preliminarmente classificados nas famílias *Togaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Mesoniviridae*, *Tymoviridae*, *Birnaviridae*, *Nodaviridae*, *Reoviridae*, *Parvoviridae*, *Iridoviridae*, *Permutotetraviridae*, *Iflaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Totiviridae* e no táxon *Negevirus* (Bolling *et al.*, 2015).

Análises filogenéticas têm mostrado que alguns ISVs, principalmente aqueles incluídos nas famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*, são intimamente relacionados a arbovírus patogênicos para humanos (Carvalho; Long, 2021). Há teorias de que os arbovírus que infectam mamíferos tenham evoluído a partir de ISVs para vírus que infectam mais de um hospedeiro, sugerindo que novos arbovírus podem surgir a partir de ISVs (Öhlund; Lundén; Blomstrom, 2019). No que diz respeito aos ISVs e hospedeiros vegetais, vírus vegetais podem ter evoluído a partir de ISVs que adquiriram a capacidade de infectar plantas, perdendo a necessidade de um hospedeiro inseto; ou ainda, vírus vegetais podem ter evoluído, ganhando a capacidade de infectar insetos, originando novos ISVs (Bolling *et al.*, 2015). Os ISVs da família *Tymoviridae* e do táxon *Negevirus* são filogeneticamente próximos a vírus vegetais, indicando que esses vírus vegetais podem desempenhar um papel nos ciclos de manutenção desses ISVs e, além disso, agrupam-se como um clado basal na árvore filogenética da *Tymoviridae*, sugerindo que ISVs podem ser ancestrais desses vírus vegetais (Carvalho; Long, 2021).

Existem experimentos que demonstram o papel dos ISVs na influência da transmissão de patógenos em mosquitos (Patterson *et al.*, 2020; Roundy *et al.*, 2017). Esses ISVs podem agir por meio de mecanismos nos quais eles mantêm um tropismo celular, bloqueando diretamente os arbovírus em seu local de ligação ou replicação, porém, essa relação é pouco compreendida, e a filogenia não parece explicar o fenótipo, já que ISVs diversos exercem esses efeitos. Além de influenciar diretamente patógenos, os ISVs podem, indiretamente, regular o sistema imunológico como vírions ou pela integração no genoma do hospedeiro (Patterson *et al.*, 2020).

Portanto, a pesquisa de diversos vírus presentes em mosquitos detém um valor inestimável para a elucidação dos processos de replicação viral dentro desses vetores. Ademais, tais estudos podem proporcionar uma compreensão aprofundada sobre os ISVs e suas interações com os hospedeiros artrópodes, assim como os vírus patogênicos que infectam e são transmitidos por esses hospedeiros (Öhlund; Lundén; Blomstrom, 2019).

2.5 VIROMA

A metagenômica representa a análise genômica de uma comunidade de microrganismos, e, na área da virologia, essa abordagem tem desempenhado um papel crucial na ampliação da compreensão dos viromas, isto é, o conjunto de vírus que se encontram em um ambiente específico, órgão ou hospedeiro (Chitcharoen; Sivapornnukul; Payungporn, 2022). Essa abordagem representa uma alternativa aos métodos clássicos, que envolvem o isolamento de vírus em animais de experimentação ou cultivos celulares, pois permite identificar vírus não cultiváveis, bem como sequenciar material genético sem conhecimento prévio do genoma dos agentes investigados (Taş *et al.*, 2021).

As pesquisas sobre o viroma de mosquitos, e de invertebrados em geral, têm proporcionado informações valiosas sobre a ampla diversidade de vírus no planeta (Moonen *et al.*, 2023). Esses estudos ampliaram significativamente a gama de hospedeiros das famílias virais, para incluir também os artrópodes, evidenciado nas famílias *Totiviridae* e *Partitiviridae* (Isawa *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2010). Além disso, foram introduzidos novos clados dentro de famílias ou ordens virais já existentes, exemplificado pelo *Artivirus* na família *Totiviridae* (Zhai *et al.*, 2010) e pelos vírus *Goukovirus*, *Herbevirus*, *Jonvirus* e *Feravirus* na família *Peribunyaviridae* (Marklewitz *et al.*, 2011, 2013). Esses avanços também demandaram a criação de novas famílias e gêneros virais, como é o caso das *Mesoniviridae* e *Negevirus* (Lauber *et al.*, 2012; Vasilakis *et al.*, 2013).

Além disso, as investigações relacionadas ao viroma de mosquitos desempenham uma função crucial no monitoramento dos vírus em circulação em diversas regiões globais. A composição do viroma de mosquitos é presumivelmente moldada por elementos ambientais, modos de transmissão viral e fatores restritivos específicos a determinadas espécies ou gêneros de mosquitos. Adicionalmente, alterações nos fatores bióticos e abióticos, associadas ao aquecimento global e à crescente globalização, podem impactar ainda mais o viroma de mosquitos. Essa abordagem tem contribuído significativamente para a ampliação do nosso conhecimento acerca dos mecanismos de transmissão, bem como para aprimorar a vigilância de potenciais patógenos. (Atoni *et al.*, 2018; Moonen *et al.*, 2023).

Estudos ao longo da última década estabeleceram que os mosquitos abrigam um viroma rico e diverso: cerca de 102 famílias virais já foram relatadas em várias

espécies de mosquitos (Atoni *et al.*, 2018; Bolling *et al.*, 2015; De Almeida *et al.*, 2021; Moonen *et al.*, 2023). As famílias de vírus RNA conhecidas por conter ISVs e/ou arbovírus foram as mais frequentes nestes estudos, incluindo *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Iflaviridae*, *Nodaviridae*, *Mesoniviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Totiviridae*. Enquanto as famílias de vírus de DNA mais observadas foram principalmente *Parvoviridae* e *Geminiviridae* (Moonen *et al.*, 2023).

Em geral, os ISVs parecem ser mais abundantes e diversos do que os arbovírus quando se compara diretamente a representação de famílias virais. Essa diversidade é baseada em estudos metagenômicos, que tendem a favorecer a identificação de vírus mais abundantes e prevalentes em populações de mosquitos. Os arbovírus parecem estar presentes apenas em 1 a 2% dos indivíduos (De Almeida *et al.*, 2021).

No Brasil, inúmeras investigações têm se concentrado na análise dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*, com especial ênfase na pesquisa dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Sabethes*, *Wyeomyia*, *Psorophora* e *Mansonia*, como é o caso dos estudos de Cunha *et al.*, (2020) que detectaram, caracterizam e realizaram análises filogenéticas de dois vírus, *Ilhéus virus* (ILHV) e *Iguape virus* (IGUV). Além disso, Cunha, *et al.*, (2020) identificaram um novo membro da família *Peribunyaviridae* nomeado como *Phasi Charoen-like virus* (PCLV). De forma semelhante, De Oliveira Ribeiro *et al.*, (2021) descobriram um novo vírus chamado *Guapiaçu virus* (GUAPV), identificado em mosquitos e em amostras humanas na região amazônica. Em outro estudo, Kenney *et al.*, (2014) caracterizaram o *Nhumirim virus* (NHUV), isolado no Pantanal brasileiro. Já Gravina *et al.*, (2019) lideraram uma pesquisa que identificou sequências do *Culex flavivirus* (CxFV) e também encontrou um novo vírus, temporariamente chamado *Sabethes flavivirus* (SbFV). Adicionalmente, em um trabalho voltado à vigilância de arbovírus, Da Silva Ribeiro *et al.*, (2022), caracterizaram 14 novas cepas pertencentes ao táxon *Negevirus*, representando uma significativa contribuição, uma vez que essas cepas foram relatadas pela primeira vez no Brasil.

O estudo de Duarte *et al.*, (2022) identificaram três possíveis cepas virais que foram nomeados *Phasi Charoen-like phasivirus isolate To-1* (PCLV To-1), *Aedes aegypti To virus 1* (AAToV1) e *Aedes aegypti To virus 2* (AAToV2). Esses vírus foram agrupados com membros das famílias *Phenuiviridae* e *Metaviridae*. A análise filogenética indicou que o PCLV To-1 foi categorizado na mesma família

(*Phenuiviridae*) que inclui o gênero *Phlebovirus*, que abrange patógenos humanos importantes, como o RVFV.

Por fim, merece menção a importância dos estudos de Da Silva Neves *et al.*, (2021) e Da Silva Ferreira *et al.*, (2020), que evidenciaram a riqueza viral que permeia as diversas espécies de mosquitos. A identificação de vírus abrangeu uma diversidade de famílias virais, incluindo *Circoviridae*, *Chuviridae*, *Flaviviridae*, *Iflaviridae*, *Mesoniviridae*, *Nodaviridae*, *Luteoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Partitiviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Totiviridae*.

Em suma, a metagenômica se configura como uma ferramenta essencial na pesquisa do espectro dos viomas, revelando um notável número de novos vírus, novos clados e famílias virais, muitos dos quais são ISVs correlacionados a arbovírus patogênicos para os seres humanos. Essas investigações desempenham uma função crucial no monitoramento global dos vírus em circulação. Além disso, o viroma de mosquitos é suscetível à influência de elementos ambientais, modos de transmissão viral e fatores específicos de espécies, tornando-se um indicador valioso das dinâmicas virais em distintas regiões. Estes progressos não apenas aprimoram o nosso entendimento científico, mas também proporcionam discernimentos essenciais para a prevenção e controle de doenças transmitidas por vetores.

3 METODOLOGIA

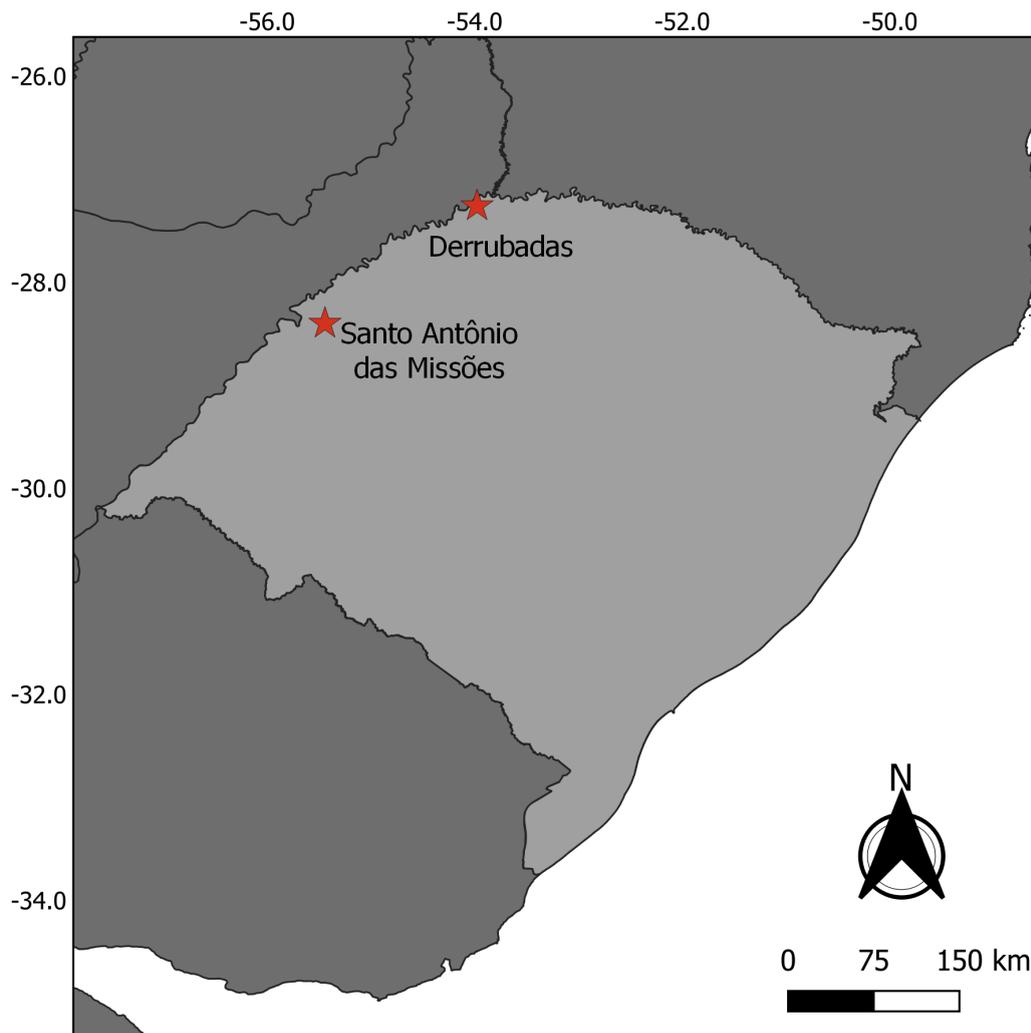
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE MOSQUITOS

As coletas ocorreram em 2021, na estação da primavera, em Derrubadas e Santo Antônio das Missões, ambas cidades localizadas na Região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul. A localidade de Santo Antônio das Missões já foi objeto de estudos de monitoramento da febre amarela em PNHs conduzidos pela equipe do CEVS. Além disso, essa região apresenta um histórico prévio de ocorrência do YFV, além de serem registrados PNHs com anticorpos para o vírus da encefalite de Saint Louis, vírus Oropouche e vírus Ilhéus (Almeida *et al.*, 2016, 2019).

A região de Derrubadas abriga um corredor de áreas protegidas que engloba territórios do Brasil, Argentina e Paraguai. Esse corredor conecta o Parque Estadual do Turvo, no estado do Rio Grande do Sul, ao Parque Nacional do Iguaçu, localizado no oeste do Paraná, e se estende até áreas florestais na Argentina (MIKHAILOVA *et al.*, 2008). Como resultado, esta área apresenta características distintas de fauna em relação ao restante do estado, o que a torna de particular interesse, dadas as possibilidades que oferece para a disseminação de patógenos.

Para este trabalho, 489 mosquitos foram coletados com apoio da Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde (DVAS) do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS). Foram utilizados puçás entomológicas, aspiradores manuais e armadilhas BG-Pro (Bioagents AG). A identificação dos mosquitos foi realizada em uma mesa fria a -20°C , sob estereomicroscópio, utilizando as chaves de Consoli; Oliveira, 1994 e Forattini, 2002. As espécies de interesse incluíram *Aedes scapularis*, *Culex* spp., *Haemagogus leucocelaenus*, *Psorophora ferox* e *Sabethes albiprivus*.

Figura 10. Mapa do Rio Grande do Sul. As estrelas em vermelho destacam os pontos de coleta em Derrubadas e Santo Antônio das Missões.



Fonte: O próprio autor.

3.2 PREPARO DOS *POOLS* PARA ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Os mosquitos capturados (no máximo 10 indivíduos) foram homogeneizados por espécie, local e data de coleta em 500 μ L de meio de cultura L-15, usando o homogeneizador de tecido Precellys 24 com esferas de vidro. Em seguida, o homogeneizado foi clarificado em uma centrífuga refrigerada a 4°C, a 8.050 rpm, por 5 minutos. A partir desses clarificados, foram coletados 100 μ L para a constituição de novos agrupamentos (*pools* de indivíduos) com no máximo 30 indivíduos de uma mesma espécie. Neste trabalho, três *pools* foram submetidos ao processamento, sendo eles dois de *Psorophora ferox* e um de *Culex* spp., totalizando 90 indivíduos para análise. O restante dos *pools* será processado posteriormente. Os *pools* foram diluídos em um volume de 5 mL de tampão fosfato (PBS) para filtração utilizando um

filtro de 0,45 μm acoplado a uma seringa. Após, as amostras foram ultracentrifugadas na presença de um colchão de sacarose 25%. Os parâmetros utilizados foram rigorosamente definidos: velocidade de 100.000 x g por minuto, por um período de 3 horas, mantendo a temperatura constante a 4°C. Ao término do procedimento, foi obtido um precipitado, que foi diluído em água ultrapura.

3.3 TRATAMENTO COM NUCLEASES E EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRAIS

Essa solução foi submetida a um tratamento com nucleases, visando degradar os ácidos nucléicos celulares potencialmente presentes na mesma. Esse procedimento foi conduzido utilizando protocolo da Turbo DNase (2U/ μL) (Invitrogen) e RNase A (Invitrogen), conforme as orientações do fabricante. A extração de ácidos nucleicos foi realizada utilizando o kit Quick-DNA/RNA Viral MagBead (Zymo), seguindo rigorosamente o protocolo fornecido pelo fabricante. Uma parte desse material foi utilizado para a síntese de cDNA, e outra parte foi separada para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA OBTENÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems, seguindo as instruções do fabricante. Entretanto, para o estudo do viroma, foi adotado o uso do primer K-random-S (GACCATCTAGCGACCTCCACMNNMNM) descrito por Stang *et al.*, 2005.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A partir da amostra de DNA, foi realizado um procedimento inicial de PCR com o primer K-random-s para uma primeira amplificação das amostras. O mix da PCR foi composto por 16,2 μL de água livre de nucleases, 2,5 μL de Buffer PCR 10X, 1 μL de dNTPs 10mM, 0,5 μL de MgCl_2 , 2 μL de primer K-random-S 10 pmol, 0,4 μL de Taq DNA Polymerase e 2,5 μL da amostra de DNA, totalizando uma reação de 25 μL . A ciclagem térmica seguiu o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por ciclos repetidos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Esses ciclos foram repetidos 35 vezes. Ao final, foi realizada uma extensão final a 72°C por 30 segundos para assegurar a conclusão adequada da reação.

3.6 AMPLIFICAÇÃO COM KLENOW

Após a síntese do cDNA e a amplificação do DNA, o próximo passo foi a amplificação usando Klenow. O mix inclui 2 µL de tampão NEBuffer 2 10X, 1 µL de Klenow, 1 µL de primer K-random-S 10 pmol, 1 µL de dNTPs 10 mM e 20 µL do produto PCR/cDNA, totalizando uma reação de 25 µL com um ciclo de temperatura a 25 °C por 20 minutos para atividade enzimática e a 75 °C por 20 minutos para inativação.

3.7 AMPLIFICAÇÃO FINAL COM O PRIMER K-S

Tanto o cDNA, quanto o produto da 1ª PCR, após o uso da enzima Klenow foram submetidos a uma amplificação utilizando o primer K-s (GACCATCTAGCGACCTCCAC) (Stang *et al.*, 2005). Com a exceção dos primers utilizados, a reação seguiu os mesmos parâmetros da PCR anteriormente descrita. A ciclagem térmica seguiu o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por ciclos repetidos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Esses ciclos foram repetidos 35 vezes. Ao final, uma extensão final a 72°C por 30 segundos para assegurar a conclusão adequada da reação.

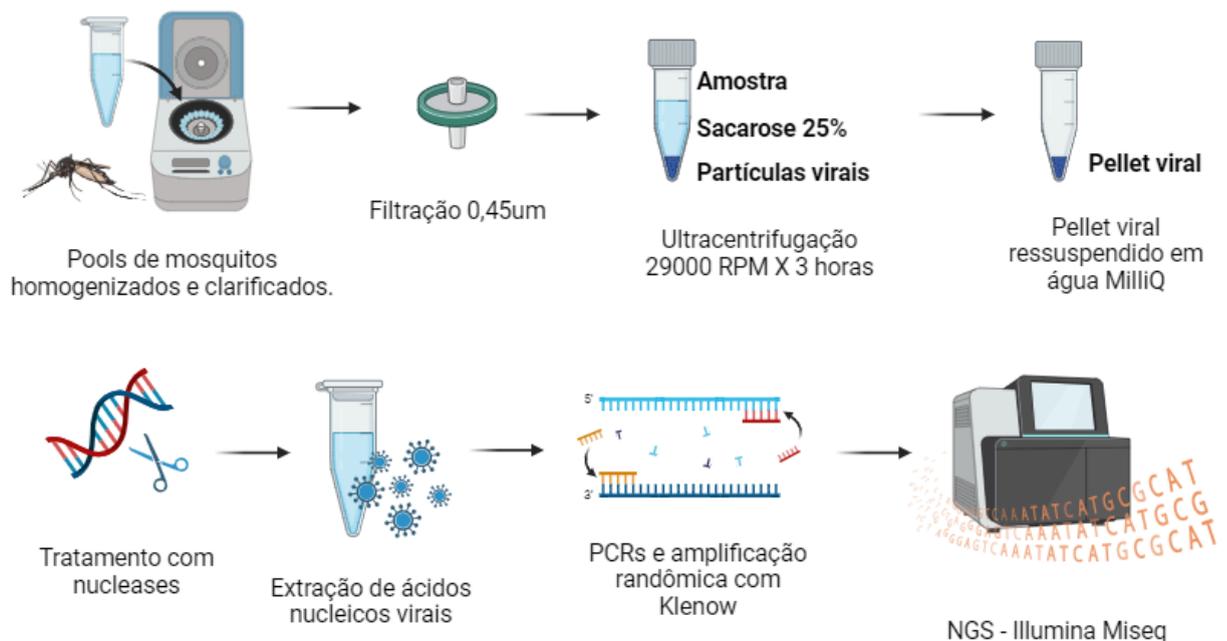
3.8 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

A purificação das amostras foi realizada com o kit AMPure XP conforme protocolo do fabricante e a quantificação realizada através do fluorômetro Qubit. Posteriormente, as amostras foram enviadas para montagem da biblioteca com Illumina COVIDseq e o sequenciamento de alto rendimento através da plataforma Illumina®, utilizando o equipamento MiSeq e kit MiSeq Reagent Kit v3, 600 ciclos, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CDCT) localizado no CEVS.

Após a fase de sequenciamento, uma avaliação foi conduzida para verificar a qualidade das sequências brutas, também denominadas *reads*, através da ferramenta FastQC (Babraham, 2023). O programa Trimmomatic foi utilizado para identificar e remover as sequências técnicas, incluindo adaptadores, primers e fragmentos, de acordo com o score de qualidade das bases (Bolger; Lohse; Usadel, 2014). As *reads* que foram submetidas ao processo de trimagem foram analisadas no software Kaiju, com o objetivo de obter uma visão geral das

sequências correspondentes a bactérias, vírus, eucariotos e sequências de origem desconhecida. A montagem *de novo* das reads foi executada no software SPAdes Genome Assembler (ferramenta metaSPAdes), resultando em sequências sobrepostas contínuas denominadas contigs, que representam a região consenso do genoma (Bankevich *et al.*, 2012; Nurk *et al.*, 2017). Os *contigs* maiores do que 300pb foram submetidos à análise pela plataforma BlastN (NCBI, 2023), com o propósito de obter informações relacionadas à correspondência dos *contigs* com vírus específicos. Baseados nesses achados, os *contigs* foram então submetidos a montagem por referência ("*map to reference*"), através do software Geneious v9.1.3.

Figura 11 Fluxograma esquemático com as principais etapas do processamento para Sequenciamento de Nova Geração.



Fonte: O próprio autor.

4 RESULTADOS

Os *pools* de *Culex* spp. e *Psorophora ferox* (1 e 2) foram processados com sucesso e geraram em média 342.782 *reads* após trimagem pelo software Trimmomatic. As sequências que passaram pelo processo de montagem de *contigs*, realizado pelo software SPAdes, totalizaram 787 *contigs*. Esses resultados estão

minuciosamente apresentados na Tabela 1. No software Kaiju, os *pools* obtiveram uma média de 82% de *reads* não classificados, 14% de *reads* bacterianas, 4% de *reads* de eucariotos e 1,5% de *reads* virais.

Tabela 1 – Apresentação das *reads* pré e pós trimmagem, os *contigs* gerados e seus respectivos tamanhos referente a cada pool.

Pool	Processamento	Reads inicial	Reads após trimmagem	Contigs gerados	Tamanho dos contigs
<i>Culex</i> spp.	DNA	159.902	153.708	85	128-1.394
<i>Culex</i> spp.	RNA	95.029	91.424	201	128-1.614
<i>Psorophora ferox</i> 1	DNA	128.096	125.403	195	128-1.215
<i>Psorophora ferox</i> 1	RNA	39.238	38.747	65	128-1.185
<i>Psorophora ferox</i> 2	DNA	64.764	63.671	59	128-1.111
<i>Psorophora ferox</i> 2	RNA	112.036	109.806	182	182-1.577

Gráfico 1- Visão geral dos *reads* analisados pelo Kaiju, revelando a seguinte distribuição: *reads* não classificados (74%), *reads* bacterianos (17%), *reads* de eucariotos (6%) e *reads* virais (3%) para *Culex* spp.

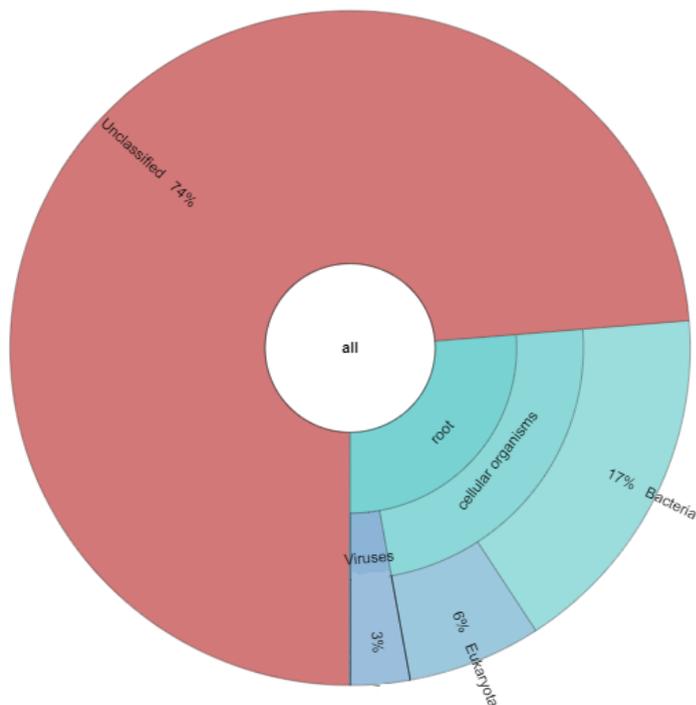


Gráfico 2- Visão geral dos *reads* analisados pelo Kaiju, revelando a seguinte distribuição: *reads* não classificados (84%), *reads* bacterianos (13%), *reads* de eucariotos (3%) e *reads* virais (0,8%) para o *pool 1* de *Psorophora ferox* .

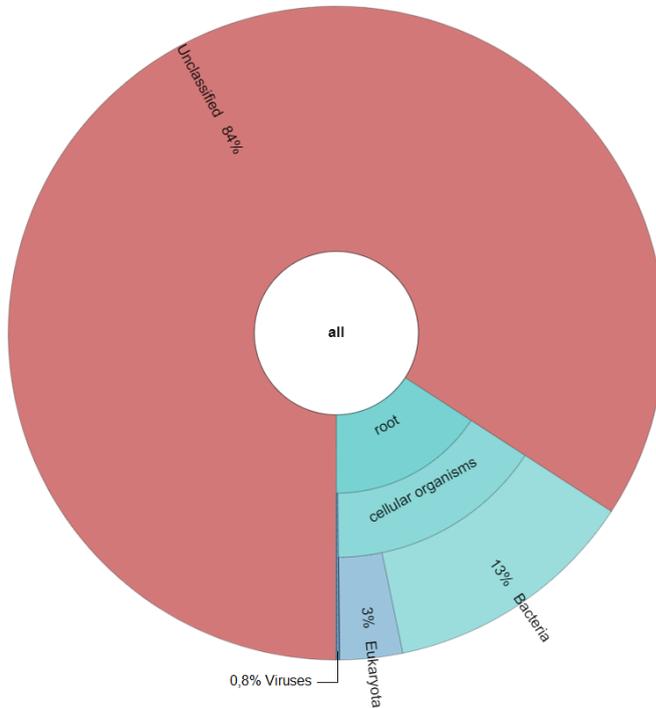
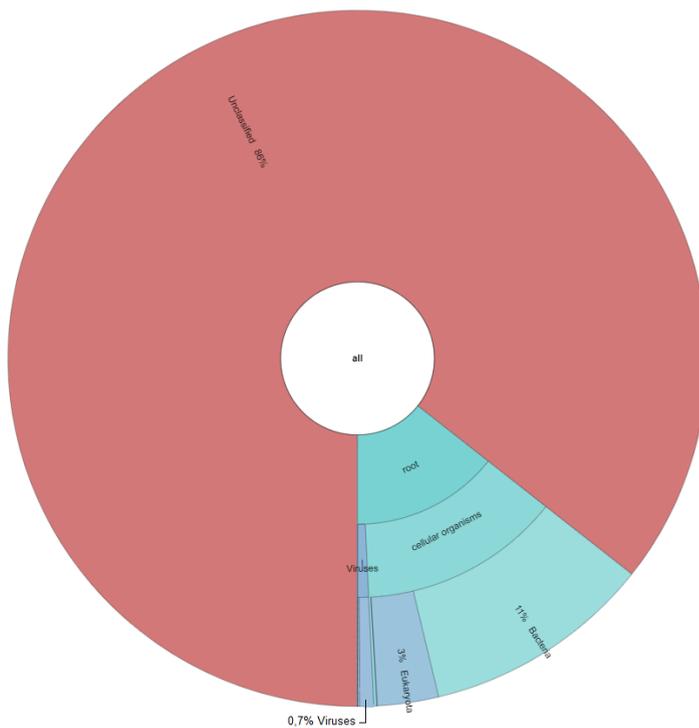


Gráfico 3- Visão geral dos *reads* analisados pelo Kaiju, revelando a seguinte distribuição: *reads* não classificados (86%), *reads* bacterianos (11%), *reads* de eucariotos (3%) e *reads* virais (0,7%) para o *pool 2* de *Psorophora ferox*.

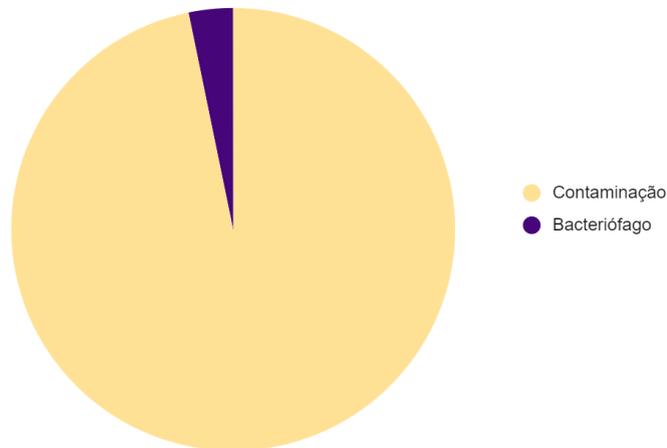
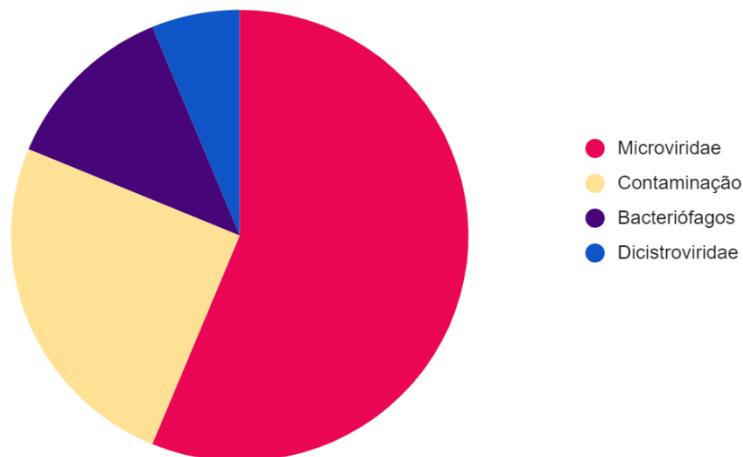
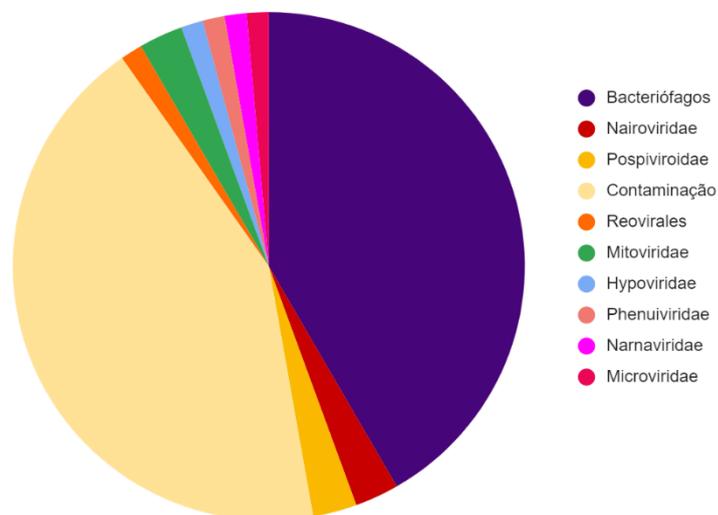


Os *contigs* maiores do que 300 pb submetidos à análise pela plataforma BlastN, com o propósito de obter informações relacionadas à correspondência dos *contigs* específicos para os vírus de maior interesse. Esses dados estão apresentados na Tabela 2 e resumidos no Gráfico 4. Os resultados integrais da análise com BlastN estão documentados na tabela presente no apêndice.

Tabela 2 – Apresentação dos principais resultados dos *contigs* de cada *pool*, juntamente com os resultados do BlastN correspondente a cada um.

Dados do contig				BLAST					
Pool	Processamento	ID contig	Tamanho do contig	Identidade (%)	Cobertura (%)	E value	Taxonomia	Descrição	Acesso NCBI
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	73	449	86.54%	11%	3,00E-04	<i>Microviridae</i>	<i>Army ant associated microvirus 2</i>	OP884053.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	75	309	100%	10%	2,00E-04	<i>Dicistroviridae</i>	<i>Dicistroviridae sp. isolate brb030dic1</i>	MN905953.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	1	1185	93,62%	3%	4,00E-07	<i>Microviridae.</i>	<i>Arizlama microvirus</i>	MW697700.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	13	609	72.33%	59%	3,00E-14	<i>Microviridae</i>	<i>Army ant associated microvirus 2</i>	OP884053.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	19	607	99.79%	77%	0.0	<i>Togaviridae</i>	<i>Semliki forest virus</i>	Z48163.2
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	10	894	93.66%	15%	1,00E-50	<i>Nairoviridae</i>	Orthonairovirus haemorrhagiae segment L	OR047175.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	13	865	83.97%	32%	2,00E-67	<i>Pospiviroidae</i>	Citrus exocortis viroid	OR024670.1

<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	19	828	87.50%	64%	3,00E-95	<i>Reovirales</i>	High Island virus S1	MF094128.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	29	727	93.33%	18%	7,00E-47	<i>Nairoviridae</i>	Orthonairovirus haemorrhagiae segment M	OR047155.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	47	632	89.92%	38%	5,00E-82	<i>Mitoviridae</i>	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus	MW454895.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	69	582	90.23%	22%	1,00E-38	<i>Hypoviridae</i>	Trichoderma hypovirus	JX291540.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	89	540	83.12%	43%	2,00E-51	<i>Pospiviroidae</i>	Citrus exocortis viroid	LC758578.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	102	519	85.12%	23%	1,00E-22	<i>Phenuiviridae</i>	Lihan tick virus	ON812284.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	167	436	87.93%	39%	1,00E-47	<i>Mitoviridae</i>	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus	MW454895.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	177	428	91.53%	13%	1,00E-11	<i>Narnaviridae.</i>	Narnaviridae sp. isolate 84-k141_21074	MZ680132.1

Gráfico 4- Síntese de cada família viral identificada nos resultados da pesquisa BlastN para cada *pool*.Porcentagem das Famílias Virais (*Culex spp.*)Porcentagem das Famílias Virais (*Ps. ferox 1*)Porcentagem das Famílias Virais (*Ps. ferox 2*)

Após a primeira verificação no Blast, procedeu-se com uma montagem "map to reference". É relevante observar que esta análise foi executada exclusivamente nos pools 1 e 2 de *Psorophora ferox*, uma vez que a ausência de reads viáveis inviabilizou a realização do procedimento no pool de *Culex* spp. O pool 1 de *Psorophora ferox*, tanto com processamento de DNA quanto de RNA, apresentou alinhamento com as sequências dos vírus *Army Ant microvirus 2*, *Apis mellifera associated microvirus 2* e *Trichosanthes kirilowii gokushovirus*. Além disso, apenas o processamento de DNA alinhou também com a sequência de *Chaq virus-like 1* (Figuras 13 a 15). O pool 2 de *Psorophora ferox*, apenas o processamento de RNA apresentou alinhamento com as sequências dos vírus *Aphis citricidus bunyavirus segment S*, *Citrus exocortis viroid isolate Najaf*, *High Island virus S3*, *Orthonairovirus haemorrhagiae segment M* e *Sclerotinia sclerotiorum mitovirus* (Figuras 16 a 20).

Figura 12 Alinhamento com a sequência *Army Ant microvirus 2* (GenBank: OP884053.1). A barra verde representa o contig formado com as reads de RNA e a barra amarela representa o contig formado com as reads de DNA do pool 1 de *Psorophora ferox*.

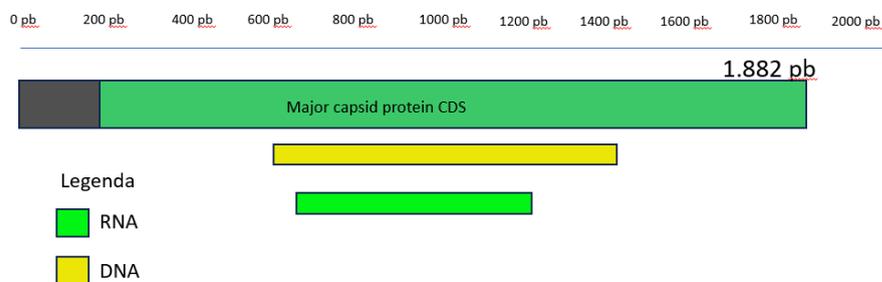


Figura 13 Alinhamento com a sequência *Apis mellifera associated microvirus 2* (GenBank: MH992161.1). A barra verde representa o contig formado com as reads de RNA e a barra amarela representa o contig formado com as reads de DNA do pool 1 de *Psorophora ferox*.

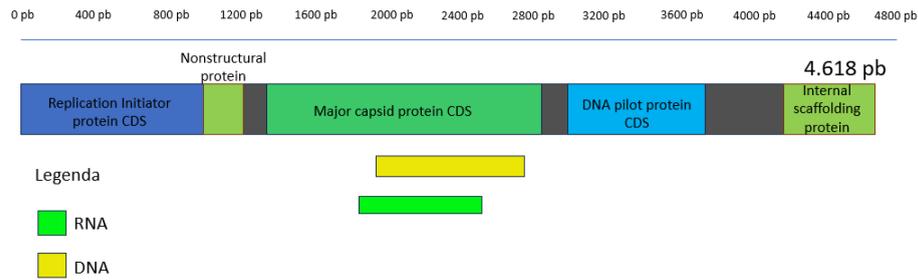


Figura 14 Alinhamento com a sequência *Trichosanthes kirilowii gokushovirus* (GenBank: MN862334.1). A barra verde representa o *contig* formado com as *reads* de RNA e a barra amarela representa o *contig* formado com as *reads* de DNA do pool 1 de *Psorophora ferox*.

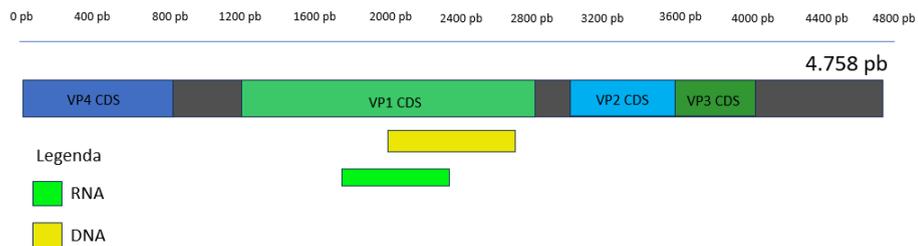


Figura 15 - Alinhamento com a sequência *Chaq virus-like 1 ORF1* (GenBank: KX148554.1). A barra amarela representa o *contig* formado com as *reads* de DNA do pool 1 de *Psorophora ferox*.

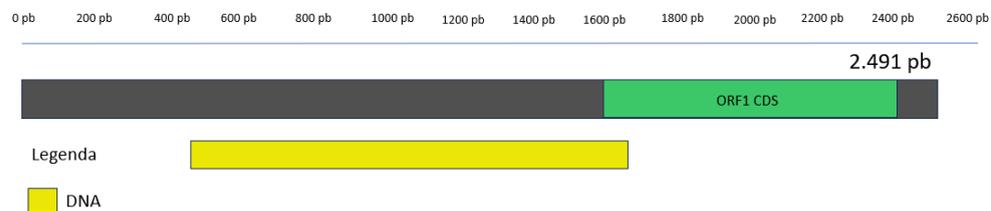


Figura 16 - Alinhamento com a sequência *Aphis citricidus bunyavirus segment S* (Família *Phenuiviridae*) (GenBank: NC_078985.1). A barra verde representa o *contig* formado com as *reads* de RNA do pool 2 de *Psorophora ferox*.

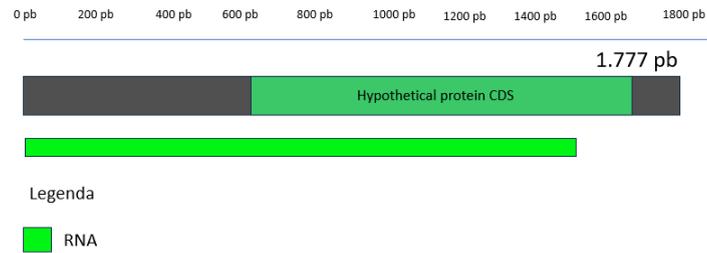


Figura 17 Alinhamento com a sequência *Citrus exocortis viroid isolate Najaf* (GenBank: OR024670.1) (Família *Pospiviroidae*). A barra verde representa o *contig* formado com as *reads* de RNA do *pool 2* de *Psorophora ferox*.

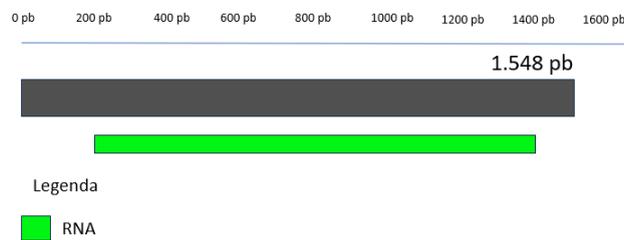


Figura 18 Alinhamento com a sequência *High Island virus S3* (GenBank: MF094130.1) (Ordem *Reovirales*). A barra verde representa o *contig* formado com as *reads* de RNA do *pool 2* de *Psorophora ferox*.

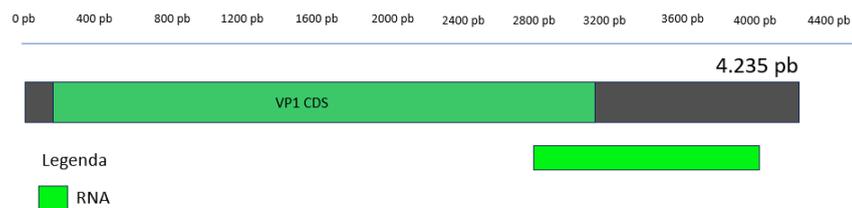


Figura 19 Alinhamento com a sequência *Orthonairovirus haemorrhagiae segment M* (GenBank: OR047155.1) (Família *Nairoviridae*). A barra verde representa o *contig* formado com as *reads* de RNA do *pool 2* de *Psorophora ferox*.

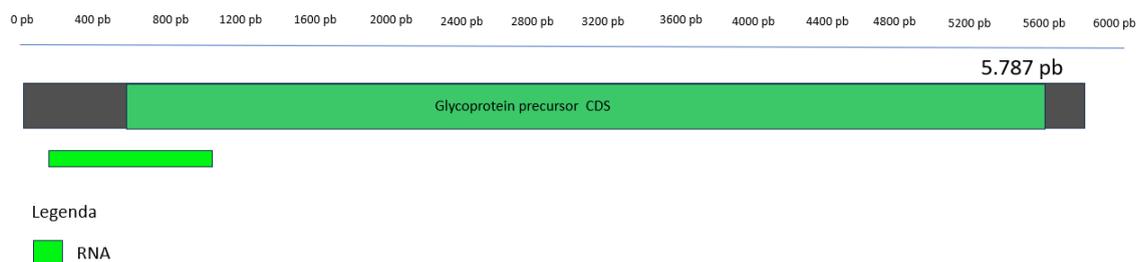
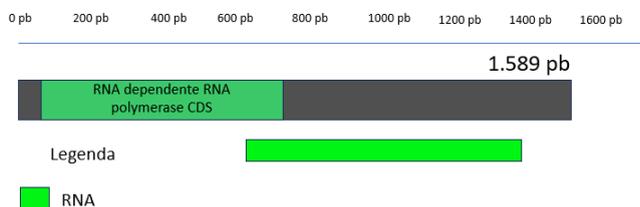


Figura 20 Alinhamento com a sequência *Sclerotinia sclerotiorum mitovirus* (GenBank:MW454895.1) (Família *Mitoviridae*) A barra verde representa o *contig* formado com as *reads* de RNA do *pool 2* de *Psorophora ferox*.



5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram conduzidas análises de viomas em *pools* de *Psorophora ferox* e *Culex* spp. coletados na região Noroeste do Rio Grande do Sul. Embora essas espécies de mosquitos sejam comumente empregadas em estudos de vioma no Brasil e em âmbito global (Atoni, *et al.*, 2017; Da Silva Ferreira *et al.*, 2020; Cunha *et al.*, 2020; Da Silva *et al.*, 2023), não existem registros publicados na literatura referentes a viomas em mosquitos no Rio Grande do Sul. Desta forma, este estudo representa a primeira investigação sobre viomas de mosquitos nessa região, preenchendo essa lacuna na pesquisa científica.

Os *pools* geraram em média 342.782 *reads* e totalizaram 787 *contigs* de 128 a 1.614 pb. No estudo conduzido por Da Silva *et al.* (2023), por exemplo, foram obtidas 593,3 milhões de *reads* distribuídos entre 10 *pools* (com 8 a 37 indivíduos), resultando na montagem de cerca de 1.285.976 *contigs*. Já no estudo de Atoni *et al.* (2017), foram obtidos aproximadamente 36.277.174 milhões de *reads*, e no estudo realizado por Mayanja *et al.* (2023), foram obtidos 5.978.259 milhões de *reads* por *pool*, com *contigs* variando de 230 a 21.147 pb. Comparando com outros estudos, fica evidente que a quantidade de *reads*, o número de *contigs* e seus tamanhos não condizem com as expectativas apresentadas na literatura, o que representa uma limitação significativa deste estudo.

Devido à alta sensibilidade do sequenciamento de nova geração, é prática comum a detecção de sequências bacterianas e de eucariotos nas amostras (Moonen *et al.*, 2023). No presente estudo, uma filtragem com um tamanho de poro de 0,45 foi aplicada para purificar as amostras, no entanto, é provável que a maioria das bactérias tenha atravessado o filtro e sido registrada nas sequências obtidas por meio

do sequenciamento. Além disso, outro problema pode ser a contaminação dos reagentes, filtros, ponteiras, água e colunas dos kits de extração com bactérias (Brumme; Poon, 2017; Jurasz; Pawłowski; Perlejewski, 2021), totalizando 14% de *reads* bacterianas no estudo. A presença de *reads* de eucariotos, correspondendo a 4% do total das *reads*, pode ser atribuída à possibilidade de que o processamento das amostras não tenha sido completamente eficaz na separação exclusiva de partículas virais, resultando na retenção de pequenas quantidades de ácidos nucleicos do hospedeiro.

Os viomas são predominantemente compostos por sequências inéditas, frequentemente com até 90% das sequências apresentando pouca ou nenhuma homologia com bancos de dados de referência (Sutton *et al.*, 2019). As conclusões encontradas na literatura estão em concordância com os resultados deste estudo, dado que a média das amostras indicou que mais de 80% das *reads* consistem em sequências não identificadas. Devido à predominância de sequências virais não caracterizadas, denominadas "matéria viral escura", e à falta de um gene marcador universal, os estudos de viroma dependem de métodos de análise independentes de banco de dados e confiam fortemente na montagem *de novo* para resolver genomas virais a partir de leituras de sequenciamento metagenômico. Esses métodos podem apresentar diversos desafios, como a distribuição desigual de sequenciamento entre os organismos na amostra, a presença de regiões conservadas entre espécies distintas e a existência de regiões repetidas nos genomas. Esses desafios têm o potencial de resultar em fragmentação e erros de montagem de *contigs*, levando a montagens incompletas ou imprecisas, bem como dificultando a atribuição adequada de sequências e contribuindo com conclusões imprecisas sobre a composição do metagenoma (Sutton *et al.*, 2019).

A principal limitação identificada neste estudo está relacionada à substancial taxa de contaminação presente nas amostras, a qual se aproximou a 100% no caso da amostra de *Culex* spp. e inviabilizou a contribuição para a avaliação da diversidade viral. Em todos os *pools*, foram identificadas famílias relacionadas à contaminação, nomeadamente: *Retroviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Orthoherpesviridae* e *Poxviridae*. Entretanto, é importante destacar que sequências de vírus dessas mesmas famílias já foram previamente detectadas em estudos anteriores (Ali *et al.*, 2021; Hameed *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2020). Embora não tenha sido descrita a presença de retrovírus de insetos na família *Retroviridae*, ainda é viável considerar

que tais sequências possam ser oriundas de retrovírus de mosquito não identificados ou de retroelementos presentes no genoma do mosquito (Moonen *et al.*, 2023).

Já foram observadas contaminação entre execuções em sequenciadores MiSeq (Illumina), que pode manifestar-se por até sete execuções sequenciais após a execução original. No entanto, modificações no procedimento de lavagem pós-execução, principalmente com a adição de uma lavagem com alvejante, resolveriam amplamente esse problema (Brumme; Poon, 2017). Além da contaminação experimental durante a preparação de bibliotecas e sequenciamento, a contaminação pode ser devido à contaminantes biológicos, como, por exemplo, sequências derivadas de refeições de sangue (Jurasz; Pawłowski; Perlejewski, 2021; Moonen *et al.*, 2023).

A presença de contaminantes consomem recursos de sequenciamento e resultam em cobertura insuficiente de vírus de baixa abundância. Espécies menos abundantes fornecem apenas informações parciais obtidas a partir de fragmentos de DNA relacionados a essas espécies. Conseqüentemente, a obtenção de genomas completos ou a montagem de *contigs* de tamanho razoável para essas espécies se torna inviável (Chen *et al.*, 2020). Assim, a presença de *contigs* de tamanho reduzido e uma cobertura limitada das sequências desses vírus podem propiciar a ocorrência de artefatos, representando sequências que possivelmente não refletem informações biológicas reais e, conseqüentemente, distorcendo os resultados de um estudo metagenômico (Chen *et al.*, 2020). Assim, é de suma importância levar em consideração tais fatores a fim de promover uma interpretação adequada tanto dos resultados deste estudo quanto da diversidade viral obtida.

A média de sequências virais identificadas entre os *pools* foi de 1,5% e abrangeu a Ordem *Reovirales* e as seguintes famílias virais: *Dicistroviridae*, *Microviridae*, *Narnaviridae*, *Phenuiviridae*, *Hypoviridae*, *Mitoviridae*, *Nairoviridae*, *Pospiviroidae*. É relevante notar que em outros estudos, uma variedade mais extensa de famílias virais foi detectada. Por exemplo, em um trabalho conduzido por Da Silva *et al.* (2023), aproximadamente 20 famílias virais foram identificadas, incluindo as famílias *Dicistroviridae*, *Phenuiviridae* e *Narnaviridae* encontradas no presente estudo, assim como as famílias *Chuviridae*, *Endonaviridae*, *Iflaviridae*, *Luteoviridae*, *Nodaviridae*, *Aliusviridae*, *Calciviridae*, *Chrysoviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Partitiviridae*, *Phasmaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Solemoviridae*, *Totiviridae*, *Virgaviridae* e *Xinmoviridae* em análise de 10 *pools* com um total de 194 mosquitos. Da mesma

forma, o estudo realizado por Da Silva Ferreira *et al.* (2020) revelou uma diversidade significativa de famílias virais em 287 *pools*, com tamanhos variando de 1 a 100 indivíduos, totalizando 10.569 mosquitos. Essas famílias virais incluíram *Circoviridae*, *Chuviridae*, *Flaviviridae*, *Iflaviridae*, *Mesoniviridae*, *Nodaviridae*, *Luteoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Partitiviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Totiviridae*. Ambos os estudos apresentaram um tamanho amostral superior ao do presente estudo, porém, a diferença na detecção de um maior número de famílias virais provavelmente está relacionada ao fato de que esses estudos obtiveram um êxito maior no sequenciamento e, conseqüentemente, um número maior de reads, permitindo a leitura completa da diversidade viral presente nos mosquitos. Apesar da menor diversidade na composição dos *pools* estudos aqui, as famílias virais identificadas corroboram com os achados de estudos anteriores (Moonen *et al.*, 2023), sugerindo que os *pools* investigados possuem uma diversidade congruente e significativa.

A composição viral variou consideravelmente entre os diferentes *pools*, sendo que no *pool* de *Culex*, nenhuma família de interesse foi identificada devido às contaminações. No *pool* 1 de *Psorophora ferox*, somente a família *Microviridae* estava presente, enquanto as demais famílias foram encontradas, embora com baixa representação, apenas no *pool* 2 de *Psorophora ferox*.

Observou-se uma abundância relevante de bacteriófagos, atingindo 41,7% no *pool* 2 de *Psorophora ferox*, por exemplo. As pesquisas metagenômicas têm a capacidade de identificar vírus de todos os organismos presentes na amostra, e os bacteriófagos foram frequentemente detectados em vários estudos, especialmente das famílias de DNA de fita dupla com cauda, como *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Autographiviridae* (Cunha *et al.*, 2020; Hameed *et al.*, 2021; Moonen *et al.*, 2023). Esses resultados ressaltam a capacidade do sequenciamento metagenômico de identificar sequências virais de bactérias que colonizam os mosquitos. Embora seja possível que a fisiologia dos mosquitos seja afetada pela infecção dos bacteriófagos que afetam os simbiontes bacterianos, o presente estudo não aprofundou essa questão (Moonen *et al.*, 2023).

A família *Microviridae* constituiu a descoberta mais abundante no âmbito deste estudo. Estes bacteriófagos apresentam características de fita simples de DNA, não são envelopados e exibem simetria icosaédrica. Importante ressaltar que a família se divide em duas categorias distintas com base em variações de morfologia,

organização genômica, homologias de sequência e preferências de hospedeiros. Estas categorias compreendem o gênero *Microvirus* e os três gêneros pertencentes à subfamília *Gokushovirinae* (Roux *et al.*, 2012) Os membros do gênero *Microvirus* demonstram afinidade pela infecção de enterobactérias e compartilham características morfológicas e organizacionais de genoma que são exemplificadas pelo fago Enterobacteria ϕ X174 (ϕ X174). É digno de nota que todos os membros atuais do gênero *Microvirus* foram isolados de *Enterobacteriaceae*. Entretanto, é relevante mencionar que investigações abrangentes em busca de membros da família *Microviridae* em outros hospedeiros ainda não foram conduzidas (ICTV, 2011).

Embora esta família seja classificada como um tipo de bacteriófago, neste estudo, conseguimos identificar microvirus associados a outros artrópodes e plantas, como exemplificado pelas espécies *Apis mellifera associated microvirus 2* (Kraberger, *et al.*, 2019), *Army Ant microvirus 2* (Fritz *et al.*, 2022) e *Trichosanthes kirilowii gokushovirus* (Yang *et al.*, 2020). É importante observar que, embora o alinhamento das sequências não tenha apresentado 100% de identidade, é possível inferir que os contigs virais obtidos estão relacionadas a uma espécie de microvirus semelhante, e talvez até mesmo a uma espécie associada a microbiota do mosquito. Também merece destaque o fato de que, na maioria das pesquisas relacionadas ao viroma em mosquitos, a família *Microviridae* é consistentemente identificada, sugerindo que sua presença é uma descoberta relevante e que esta família é abundantemente encontrada nos mosquitos (Xia *et al.*, 2018; Hameed *et al.*, 2020; Omuoyo *et al.*, 2023)

Outra família de relevância que apareceu no *pool 2* de *Psorophora ferox* foi a *Nairoviridae*, principalmente em associação ao vírus *Orthonairovirus haemorrhagiae* segmento M. Os membros da família *Nairoviridae* produzem vírions envelopados contendo genomas compostos por três segmentos de RNA de sentido negativo de fita simples semelhante ao que já foi descrito anteriormente para a família *Orthobunyavirus*, já que pertencem a mesma ordem *Bunyavirales*. Uma observação de relevância consiste na manutenção dos nairovirus em artrópodes, o que sublinha a importância desta descoberta (Hughes *et al.*, 2020). Embora o alinhamento para o vírus *Orthonairovirus haemorrhagiae* não tenha resultado em uma conclusão definitiva de similaridade, podemos inferir que essas sequências estão relacionadas à família, uma vez que já foram identificadas em outros estudos de viroma em mosquitos (Kapuscinski *et al.*, 2021; Ortiz-Baez *et al.*, 2022; Mayanja *et al.*, 2023).

Na ordem *Reovirales*, algumas sequências do *pool 2* de *Psorophora ferox* foram associadas exclusivamente ao segmento 3 da sequência do vírus *High Island*. Cabe ressaltar que, até o momento, esse vírus ainda não foi classificado em nenhuma família específica dentro da Ordem *Reovirales*. Foi descrito pela primeira vez em *Psorophora ciliata* coletados em *High Island*, no condado de Galveston, Texas, onde a partir de um isolado de um novo reovírus foram montados seis segmentos (s1, s2, s3, s4, s6, s8) do vírus (Sadeghi *et al.*, 2017). O vírus *High Island* também foi encontrado em um estudo de metagenômica de *Aedes albopictus* (Rau *et al.*, 2022), assim como um reovírus com alta similaridade ao *High Island* foi encontrado em outro díptero conhecido como “mosca de morcego” (Diptera: Hippoboscoidea) (Temmam *et al.*, 2019).

Na família *Phenuiviridae*, foi possível identificar o segmento S do vírus *Aphis citricidus bunyavirus* no *pool 2* de *Psorophora ferox*. Este vírus foi inicialmente identificado em insetos da espécie *Aphis citricidus* por meio de análise metagenômica, e o segmento S apresenta uma sequência que codifica uma nucleoproteína típica dos gêneros *Tenuivirus* e *Phlebovirus* (Zhang *et al.*, 2019). Uma vez que o alinhamento das *reads* para essa sequência não demonstrou total similaridade, é possível deduzir que essa sequência pode estar relacionada a um vírus diferente, dado que a família em questão é comumente identificada em outros estudos de metagenômica envolvendo mosquitos (Xia *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019; Mayanja *et al.*, 2023).

Da família *Pospiviroidae*, as *reads* do *pool 2* de *Psorophora ferox* foram associadas com a sequência *Citrus exocortis viroid*. Os membros da família *Pospiviroidae* têm genomas compostos por RNAs circulares de fita simples que variam em tamanho de cerca de 246 a 375 nucleotídeos (Di Serio *et al.* 2021). Os vírus em questão infectam naturalmente espécies de plantas angiospermas e são predominantemente disseminados por meio da propagação vegetativa de plantas já contaminadas (Di Serio *et al.*, 2021). Adicionalmente, é importante destacar que muitos destes vírus podem ser transmitidos por sementes e pólen. Dado que os mosquitos também se alimentam de plantas e desempenham um papel relevante como polinizadores, é provável que esses tenham sido ingeridos pelos mosquitos durante a alimentação. Se os mosquitos exercem um papel biológico significativo na manutenção e/ou transmissão desses vírus para plantas ainda é algo a ser estudado. Além disso, foi documentada a transmissão de alguns membros desta família por abelhas-bombus e moscas-brancas; da mesma forma, a importância destas vias de

transmissão na natureza ainda carece de uma compreensão completa (Vernière *et al.*, 2006).

Outro achado foi o vírus *Sclerotinia sclerotiorum mitovirus* pertencente à família *Mitoviridae*. Esta família é caracterizada por "vírus de RNA nu" que replicam nas mitocôndrias, com genomas que codificam apenas a RNA polimerase dependente de RNA e são prevalentes em fungos, plantas e invertebrados (Ezawa *et al.*, 2023). *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo fitopatogênico ascomiceto com distribuição global e a capacidade de atacar mais de 400 espécies de plantas, incluindo diversas ervas daninhas e culturas importantes, como o girassol, a soja, a colza (canola) e várias hortaliças. (Mu *et al.*, 2018). Pode-se inferir que o mosquito tenha se alimentado de uma planta contaminada com o fungo, e, devido à análise abrangente do organismo do mosquito, detectamos a presença dessa família de vírus proveniente de sua alimentação.

Por fim, também foi possível identificar no *pool* 1 de *Psorophora ferox* um vírus previamente não classificado, denominado *Chaq virus-like 1*. É importante citar que este vírus está associado a invertebrados e foi encontrado pela primeira vez em um estudo sobre o viroma da espécie de mosquito *Anopheles gambiae* na Libéria, África Ocidental (Fauver *et al.*, 2016). Este achado é de significativa importância, pois destaca a relevância da descoberta de novos vírus em sequências de *reads* ainda não classificadas.

Outras famílias identificadas no Blast não exibiram alinhamentos satisfatórios com sequências de vírus de espécies específicas. É possível que esses *contigs* estejam associados a algumas famílias, mas ainda não tenham sido classificados de maneira definitiva em uma espécie particular. Além disso, é plausível que essas sequências possam ser meros artefatos sem significado substancial.

É importante citar que o maior aumento do conhecimento sobre a diversidade de vírus como resultado da metagenômica ocorreu nos invertebrados (Webster *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016), e a prevalência de vírus de RNA é consistentemente superior em invertebrados quando comparada a vertebrados, sugerindo uma notável capacidade dos invertebrados em tolerar cargas significativas de vírus. Essa constatação está alinhada com as conclusões do nosso estudo, no qual observamos uma maior diversidade de vírus de RNA nas amostras analisadas.

No entanto, esses estudos têm alcance limitado e ainda existem lacunas substanciais em nosso conhecimento da biodiversidade de vírus em ambos os

aspectos filogenéticos e genômicos para a maioria dos invertebrados, um fato que pode ter importantes implicações para nossa compreensão da evolução, ecologia e emergência de vírus. Com essa consideração em mente, o presente trabalho surgiu a partir dessa premissa e teve como principal objetivo revelar a diversidade anteriormente não explorada dos vírus que afetam invertebrados, principalmente nos vírus de RNA, dada a sua ampla prevalência. Apesar das adversidades presentes neste estudo, torna-se evidente a relevância e o potencial dessas amostras de mosquitos para a obtenção de resultados significativos relacionados à diversidade viral.

CONCLUSÃO

Neste estudo, exploramos a importância da metagenômica na compreensão das comunidades microbianas, com foco nos viromas. Observamos que a maioria das sequências virais é pouco conhecida, e a análise depende de métodos independentes de banco de dados e montagem *de novo*. Identificamos a presença significativa de bacteriófagos em mosquitos, ressaltando a capacidade do sequenciamento metagenômico. No entanto, enfrentamos desafios, como contaminação e erros de sequenciamento, que impactaram nossos resultados.

Nossa pesquisa revelou diversas famílias virais, incluindo *Microviridae*, *Nairoviridae*, *Phenuiviridae* e *Pospiviroidae*, ampliando o conhecimento sobre a diversidade viral em mosquitos. Essas descobertas contribuem para o entendimento das complexas interações entre mosquitos e vírus. Além disso, enfatizamos a necessidade de abordar as limitações inerentes à análise virológica em sequenciamentos metagenômicos, como a "matéria viral escura" e os desafios de montagem e contaminação. Esses aspectos ressaltam a complexidade da pesquisa em virologia e sugerem que investigações futuras devem levar em consideração esses fatores.

No geral, este estudo oferece informações valiosas sobre a diversidade viral em mosquitos, destacando tanto as oportunidades quanto as limitações da metagenômica nesse contexto. O esperado é que esta pesquisa possa servir como um ponto de partida para estudos adicionais e contribuir para a compreensão mais aprofundada das interações entre mosquitos e vírus. Logo, como perspectiva, é de interesse continuar a investigação, aprofundando a análise da diversidade viral em mosquitos e, principalmente, melhorar as técnicas envolvendo o processamento das amostras e do sequenciamento para reduzir a contaminação e os erros, a fim de obter resultados mais pertinentes e precisos acerca dos vírus presentes nos mosquitos.

REFERÊNCIAS

- ABDULJALIL, Jameel M.; ABD AL GALIL, Fahd M. Molecular pathogenesis of dengue virus infection in *Aedes* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 138, p. 104367, 2022.
- ALI, Renee *et al.* Characterization of the virome associated with *Haemagogus* mosquitoes in Trinidad, West Indies. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 16584, 2021.
- ALMEIDA, Marco Antonio Barreto De *et al.* Detection of antibodies against Icoaraci, Ilhéus, and Saint Louis Encephalitis arboviruses during yellow fever monitoring surveillance in non-human primates (*Alouatta caraya*) in southern Brazil. **Journal of Medical Primatology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 211–217, 2019.
- ALTO, Barry W.; LOUNIBOS, L. Philip. Vector competence for arboviruses in relation to the larval environment of mosquitoes. *In*: TAKKEN, Willem; KOENRAADT, Constantianus J. M. **Ecology of parasite-vector interactions**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2013. p. 81–101. Disponível em: http://link.springer.com/10.3920/978-90-8686-744-8_4. Acesso em: 2 nov. 2023.
- ANDREW STEVENSON JOEL CHANDRANESAN. Reoviruses Clinical Presentation. *In*: REOVIRUSES CLINICAL PRESENTATION. 10 ago. 2023. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/227348-clinical?form=fpf>. Acesso em: 10 out. 2023.
- ARTSOB, Harvey; LINDSAY, Robbin; DREBOT, Michael. Arboviruses. *In*: INTERNATIONAL ENCYCLOPEDIA OF PUBLIC HEALTH. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 154–160. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128036785000230>. Acesso em: 8 out. 2023.
- ATONI, Evans *et al.* Metagenomic Virome Analysis of *Culex* Mosquitoes from Kenya and China. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 30, 2018.
- BOLLING, Bethany *et al.* Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 4911–4928, 2015.
- BRUMME, Chanson J.; POON, Art F.Y. Promises and pitfalls of Illumina sequencing for HIV resistance genotyping. **Virus Research**, [s. l.], v. 239, p. 97–105, 2017.
- CAROLINA SALUSTINO DOS SANTOS, Maria *et al.* ARBOVIROSIS: EPIDEMIOLOGY AND HEALTH CARE. **Health and Society**, [s. l.], v. 2, n. 02, p. 07–20, 2022.
- CARVALHO, Valéria L.; LONG, Maureen T. Insect-Specific Viruses: An overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. **Virology**, [s. l.], v. 557, p. 34–43, 2021.
- CHEN, Lin-Xing *et al.* Accurate and complete genomes from metagenomes. **Genome Research**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 315–333, 2020.
- CHITCHAROEN, Suwalak; SIVAPORNNUKUL, Pavaret; PAYUNGPORN, Sunchai. Revolutionized virome research using systems microbiology approaches. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 247, n. 13, p. 1135–1147, 2022.
- CONSOLI, Rotrout A. G. B.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. Rio de Janeiro, RJ, **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ, 1994.
- CUNHA, Marielton Dos Passos *et al.* A Metagenomic Approach Identified a Novel Phasi Charoen-Like Virus Coinfecting a Chikungunya Virus-Infected *Aedes aegypti* Mosquito in Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, [s. l.], v. 9, n. 31, p. e01572-19, 2020.
- CUNHA, Mariana Sequetin *et al.* Detection and characterization of Ilheus and Iguape virus genomes in historical mosquito samples from Southern Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 205, p. 105401, 2020.
- DA SILVA, Alexandre Freitas *et al.* **RNA virome of sylvatic mosquitoes from northeast Brazil reveals a divergent and diverse insect-specific viral community**. [S. l.]: Genomics, 2023. preprint. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.06.27.546706>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- DA SILVA FERREIRA, Raquel *et al.* Insect-specific viruses and arboviruses in adult male culicids from Midwestern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 85, p. 104561, 2020.

- DA SILVA NEVES, Nilvanei Aparecido *et al.* Sialovirome of Brazilian tropical anophelines. **Virus Research**, [s. l.], v. 302, p. 198494, 2021.
- DA SILVA RIBEIRO, Ana Cláudia *et al.* Negevirus isolated from mosquitoes in the Brazilian Amazon. **Virology Journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 17, 2022.
- DE ALMEIDA, João Pp *et al.* The virome of vector mosquitoes. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 49, p. 7–12, 2021.
- DE OLIVEIRA RIBEIRO, Geovani *et al.* Guapiçu virus, a new insect-specific flavivirus isolated from two species of *Aedes* mosquitoes from Brazil. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 4674, 2021.
- DUARTE, Matheus A. *et al.* Identification of potential new mosquito-associated viruses of adult *Aedes aegypti* mosquitoes from Tocantins state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 51–62, 2022.
- ELREFAEY, Ahmed Me *et al.* Understanding the Mechanisms Underlying Host Restriction of Insect-Specific Viruses. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 964, 2020.
- EZAWA, Tatsuhiro *et al.* Structurally distinct mitoviruses: are they an ancestral lineage of the *Mitoviridae* exclusive to arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycotina)? **mBio**, [s. l.], p. e00240-23, 2023.
- FAUVER, Joseph R. *et al.* West African *Anopheles gambiae* mosquitoes harbor a taxonomically diverse virome including new insect-specific flaviviruses, mononegaviruses, and totiviruses. **Virology**, [s. l.], v. 498, p. 288–299, 2016.
- FOSTER, Woodbridge A.; WALKER, Edward D. Mosquitoes (Culicidae). *In: MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2019a. p. 261–325. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140437000157>. Acesso em: 7 out. 2023.
- FOSTER, Woodbridge A.; WALKER, Edward D. Mosquitoes (Culicidae). *In: MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2019b. p. 261–325. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140437000157>. Acesso em: 7 out. 2023.
- FRITZ, Matthieu *et al.* **African army ants at the forefront of virome surveillance in a remote tropical forest**. [S. l.]: Microbiology, 2022. preprint. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.12.13.520061>. Acesso em: 7 nov. 2023.
- GRAVINA, Humberto Doriguêto *et al.* Identification of insect-specific flaviviruses in areas of Brazil and Paraguay experiencing endemic arbovirus transmission and the description of a novel flavivirus infecting *Sabethes belisarioi*. **Virology**, [s. l.], v. 527, p. 98–106, 2019.
- HAMEED, Muddassar *et al.* A Metagenomic Analysis of Mosquito Virome Collected From Different Animal Farms at Yunnan–Myanmar Border of China. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 591478, 2021.
- HARBACH, Ralph E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny *. [s. l.], 2007. Disponível em: <https://zenodo.org/record/180118>. Acesso em: 7 out. 2023.
- HAWKES, Frances M.; HOPKINS, Richard J. The mosquito. *In: HALL, Marcus; TAMİR, Dan. Mosquitopia*. 1. ed. London: Routledge, 2021. p. 16–31. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781003056034/chapters/10.4324/9781003056034-3>. Acesso em: 8 out. 2023.
- HE, Xiaozhou *et al.* Metagenomic sequencing reveals viral abundance and diversity in mosquitoes from the Shaanxi-Gansu-Ningxia region, China. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. e0009381, 2021.
- HORNE, Kate; VANLANDINGHAM, Dana. Bunyavirus-Vector Interactions. **Viruses**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 4373–4397, 2014.
- HUBÁLEK, Zdenek; RUDOLF, Ivo; NOWOTNY, Norbert. Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. *In: ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*. [S. l.]: Elsevier, 2014. v. 89, p. 201–275. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001721000057>. Acesso em: 9 out. 2023.
- ISAWA, Haruhiko *et al.* Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan. **Virus Research**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 147–155, 2011.
- JURASZ, Henryk; PAWŁOWSKI, Tomasz; PERLEJEWSKI, Karol. Contamination Issue in

- Viral Metagenomics: Problems, Solutions, and Clinical Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 745076, 2021.
- KAIN, Morgan P. *et al.* Not all mosquitoes are created equal: A synthesis of vector competence experiments reinforces virus associations of Australian mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. e0010768, 2022.
- KAPUSCINSKI, Marylee L. *et al.* Genomic characterization of 99 viruses from the bunyavirus families Nairoviridae, Peribunyaviridae, and Phenuiviridae, including 35 previously unsequenced viruses. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. e1009315, 2021.
- KENNEY, Joan L. *et al.* Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 95, n. 12, p. 2796–2808, 2014.
- KRABERGER, Simona *et al.* Diverse single-stranded DNA viruses associated with honey bees (*Apis mellifera*). **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 71, p. 179–188, 2019.
- LAUBER, Chris *et al.* Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 157, n. 8, p. 1623–1628, 2012.
- MARKLEWITZ, Marco *et al.* Discovery of a Unique Novel Clade of Mosquito-Associated Bunyaviruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 23, p. 12850–12865, 2013.
- MARKLEWITZ, M. *et al.* Gouléako Virus Isolated from West African Mosquitoes Constitutes a Proposed Novel Genus in the Family Bunyaviridae. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 85, n. 17, p. 9227–9234, 2011.
- MAYANJA, Martin N. *et al.* **Mosquito virus diversity in Western and North-western Uganda**. [S. l.]: Genomics, 2023. preprint. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.11.02.565349>. Acesso em: 7 nov. 2023.
- MOONEN, Jurgen P. *et al.* Composition and global distribution of the mosquito virome - A comprehensive database of insect-specific viruses. **One Health**, [s. l.], v. 16, p. 100490, 2023.
- MOSQUITO TAXONOMY INVENTORY. Aedini. *In*: 18 ago. 2015. Disponível em: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/8577>. Acesso em: 7 out. 2023.
- MOSQUITO TAXONOMY INVENTORY. Culicidae. *In*: 2 nov. 2008. Disponível em: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>. Acesso em: 7 out. 2023.
- MOSQUITO TAXONOMY INVENTORY. Valid Species. *In*: 27 jul. 2023. Disponível em: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/valid-species-list>. Acesso em: 7 out. 2023.
- MU, Fan *et al.* Virome Characterization of a Collection of *S. sclerotiorum* from Australia. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 2540, 2018.
- NOOIJ, Sam *et al.* Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 749, 2018.
- ÖHLUND, Pontus; LUNDÉN, Hanna; BLOMSTRÖM, Anne-Lie. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. **Virus Genes**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 127–137, 2019.
- OMUOYO, Donwilliams O. *et al.* Metagenomic analysis of coastal Kenya female *Aedes aegypti* mosquito RNA metaviromes reveal presence of diverse insect specific viruses. **Wellcome Open Research**, [s. l.], v. 8, p. 136, 2023.
- ONG, Ruo-Yan; LUM, Fok-Moon; NG, Lisa Fp. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. **Future Virology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 313–330, 2014.
- ORTIZ-BAEZ, Ayda Susana *et al.* Meta-transcriptomics reveals potential virus transfer between *Aedes communis* mosquitoes and their parasitic water mites. **Virus Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. veac090, 2022.
- RACANIELLO, Vincent R. *et al.* **Principles of Virology**. [S. l.]: American Society of Microbiology, 2015. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819521>. Acesso em: 5 nov. 2023.

- RAU, Janine *et al.* The microbial RNA metagenome of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Germany. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 121, n. 9, p. 2587–2599, 2022.
- RIBEIRO, Geovani De Oliveira *et al.* *Aedes aegypti* from Amazon Basin Harbor High Diversity of Novel Viral Species. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 866, 2020.
- RIBEIRO, Mário Sérgio *et al.* High Prevalence of a Newly Discovered Wutai Mosquito Phasivirus in Mosquitoes from Rio de Janeiro, Brazil. **Insects**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 135, 2019.
- ROUNDY, Christopher M. *et al.* Insect-Specific Viruses. *In: ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*. [S. l.]: Elsevier, 2017. v. 98, p. 119–146. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352716300641>. Acesso em: 10 out. 2023.
- RUEDA, Leopoldo M.; DEBBOUN, Mustapha. Taxonomy, Identification, and Biology of Mosquitoes. *In: MOSQUITOES, COMMUNITIES, AND PUBLIC HEALTH IN TEXAS*. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 3–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128145456000018>. Acesso em: 7 out. 2023.
- RYU, Wang-Shick. Rhabdovirus. *In: MOLECULAR VIROLOGY OF HUMAN PATHOGENIC VIRUSES*. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 187–194. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012800838600014X>. Acesso em: 10 out. 2023.
- SADEGHI, Mohammadreza *et al.* Genomes of viral isolates derived from different mosquito species. **Virus Research**, [s. l.], v. 242, p. 49–57, 2017.
- SHAHHOSSEINI, Nariman *et al.* Detection and characterization of a novel rhabdovirus in *Aedes cantans* mosquitoes and evidence for a mosquito-associated new genus in the family Rhabdoviridae. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 55, p. 260–268, 2017.
- STANG, Alexander *et al.* Characterization of Virus Isolates by Particle-Associated Nucleic Acid PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 716–720, 2005.
- SUTTON, Thomas D. S. *et al.* Choice of assembly software has a critical impact on virome characterisation. **Microbiome**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12, 2019.
- TAŞ, Neslihan *et al.* Metagenomic tools in microbial ecology research. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 67, p. 184–191, 2021.
- TEMMAM, Sarah *et al.* Six Nearly Complete Genome Segments of a Novel Reovirus Identified in Laotian Batflies. **Microbiology Resource Announcements**, [s. l.], v. 8, n. 46, p. e00733-19, 2019.
- VAN LEUR, Sophie Wilhelmina *et al.* Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 2814–2838, 2021.
- VASILAKIS, Nikos *et al.* Negevirus: a Proposed New Taxon of Insect-Specific Viruses with Wide Geographic Distribution. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 2475–2488, 2013.
- VERNIÈRE, C. *et al.* Interactions Between Citrus Viroids Affect Symptom Expression and Field Performance of Clementine Trees Grafted on Trifoliolate Orange. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 356–368, 2006.
- WOOLEY, John C.; YE, Yuzhen. Metagenomics: Facts and Artifacts, and Computational Challenges. **Journal of Computer Science and Technology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 71–81, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vector-borne diseases. *In: 2 mar. 2020*. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em: 8 out. 2023.
- WU, Pa *et al.* Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 21, p. e1, 2019.
- XIA, Han *et al.* Comparative Metagenomic Profiling of Viromes Associated with Four Common Mosquito Species in China. **Virologica Sinica**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 59–66, 2018.
- YANG, Shixing *et al.* **Virome of riverside phytocommunity ecosystem of an ancient canal**. [S. l.]: In Review, 2020. preprint. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-25620/v1>. Acesso em: 7 nov. 2023.
- ZAID, Ali *et al.* Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. e123–e133, 2021.
- ZHAI, Y. *et al.* Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus,

the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family Totiviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 91, n. 11, p. 2836–2845, 2010.

ZHANG, Wei *et al.* Characterization of a new bunyavirus and its derived small RNAs in the brown citrus aphid, *Aphis citricidus*. **Virus Genes**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 557–561, 20

APÊNDICE A

Este Apêndice contém a tabela mencionada ao longo do trabalho, fornecendo uma visão clara do que foi dito, complementando e reforçando os argumentos discutidos no trabalho, oferecendo uma referência rápida e completa para os leitores interessados em examinar os dados tabulados.

Tabela A.1 - Apresentação completa dos resultados dos *contigs* de cada *pool*, juntamente com os resultados do BlastN correspondente a cada um.

Dados do contig				BLAST					
Pool	Processamento	ID contig	Tamanho do contig	Identidade (%)	Cobertura (%)	E value	Taxonomia	Descrição	Acesso NCBI
<i>Culex</i>	DNA	5	1146	88.27%	17%	3e-57	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Culex</i>	DNA	12	938	100.00%	7%	4e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	13	868	76.34%	29%	6e-28	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1
<i>Culex</i>	DNA	16	812	100.00%	7%	4e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	18	807	100.00%	4%	1e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	22	784	91.46%	10%	1e-20	<i>Caudovirales</i>	<i>Caudovirales phage</i>	LR796233.1
<i>Culex</i>	DNA	28	689	100.00%	8%	3e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	30	654	81.98%	34%	3e-40	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1
<i>Culex</i>	DNA	31	649	75.99%	82%	1e-78	<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Human gammaherpesvirus 4</i>	MH590442.1
<i>Culex</i>	DNA	32	612	100.00%	16%	8e-11	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	34	567	100.00%	9%	3e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	35	561	100.00%	5%	4e-3	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	41	530	98.48%	12%	5e-22	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1
<i>Culex</i>	DNA	42	521	100.00%	5%	3e-04	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	47	505	85.48%	24%	8e-25	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1
<i>Culex</i>	DNA	48	488	88.41%	27%	2e-35	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1
<i>Culex</i>	DNA	54	472	87.38%	43%	1e-57	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1

<i>Culex</i>	DNA	56	467	90.70%	45%	3e-44	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate 121pt</i>	MK383838.1
<i>Culex</i>	DNA	58	459	100.00%	13%	2e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	62	447	100.00%	10%	4e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	DNA	73	431	100.00%	19%	5e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	RNA	13	715	89.26%	63%	2e-97	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Culex</i>	RNA	18	659	87.75%	30%	1e-58	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Culex</i>	RNA	20	651	76.34%	34%	3e-40	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate BC001</i>	OQ752844.1.1
<i>Culex</i>	RNA	22	636	74.50%	82%	2e-51	<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Human gammaherpesvirus 4</i>	MH590442.1
<i>Culex</i>	RNA	33	529	100.00%	5%	1e-10	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	RNA	41	497	98.46%	13%	2e-21	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate 254p</i>	MK384503.1
<i>Culex</i>	RNA	43	480	100.00%	15%	4e-08	<i>Coronaviridae</i>	<i>Bat Coronavirus</i>	OQ175313.1
<i>Culex</i>	RNA	46	472	88.00%	42%	3e-58	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Culex</i>	RNA	48	467	90.70%	27%	3e-44	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate 254p</i>	MK384503.1
<i>Culex</i>	RNA	57	431	89.50%	46%	3e-63	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Ps. ferox</i>	DNA	1	1215	93,62%	3%	4,00E-07	<i>Microviridae.</i>	<i>Arizlama microvirus</i>	MW697700.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	5	938	77.42%	15%	9,00E-12	<i>Microviridae.</i>	<i>Microviridae sp. isolate ctfh688</i>	MH617316.2
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	10	773	77.45%	39%	3,00E-40	<i>Microviridae.</i>	<i>Microvirus sp. isolate LSWO_192</i>	OR350167.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	15	716	89.23%	41%	2,00E-97	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1

<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	34	545	88.55%	54%	4,00E-93	<i>Togaviridae.</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	39	540	81,82%	14%	3,00E-10	<i>Herelleviridae</i>	<i>Bacillus phage Maceta</i>	MH538296.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	40	532	100%	4%	1,60E-02	<i>Myoviridae</i>	<i>Escherichia phage P1,</i>	MH445381.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	41	517	75.61%	39%	2,00E-16	<i>Microviridae.</i>	<i>Microvirus sp. isolate 6538_52</i>	MT310039.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	73	449	86.54%	11%	3,00E-04	Microviridae	Army ant associated microvirus 2	OP884053.1
<i>Ps. ferox 1</i>	DNA	75	309	100%	10%	2,00E-04	Dicistroviridae	Dicistroviridae sp. isolate brb030dic1	MN905953.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	1	1185	93,62%	3%	4,00E-07	Microviridae.	Arizlama microvirus	MW697700.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	6	793	88,27%	24%	2,00E-57	Togaviridae	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	8	709	89.23%	41%	2,00E-97	<i>Togaviridae</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	13	609	72.33%	59%	3,00E-14	<i>Microviridae</i>	<i>Army ant associated microvirus 2</i>	OP884053.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	39	471	90.91%	14%	1,00E-13	<i>Microviridae.</i>	<i>Microviridae sp. isolate CN7_L19_268</i>	MT208615.1
<i>Ps. ferox 1</i>	RNA	41	467	77.43%	67%	1,00E-42	<i>Microviridae;</i>	<i>Microvirus sp. isolate LSWO_55</i>	OR350094.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	2	1099	83.73%	18%	6,00E-44	<i>Togaviridae</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	12	688	90.83%	17%	4,00E-34	<i>Togaviridae</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	19	607	99.79%	77%	0.0	<i>Togaviridae</i>	<i>Semliki forest virus</i>	Z48163.2
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	22	562	87.02%	36%	6,00E-56	<i>Togaviridae;</i>	<i>Chikungunya virus isolate</i>	OL343610.1

<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	24	559	88.24%	45%	1,00E-78	<i>Poxviridae</i>	<i>Orf virus</i>	HM133903.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	27	530	81.82%	26%	2,00E-21	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate</i> 074-AP-119-1-3_w0_1 10	MZ766785.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	29	521	84.42%	43%	3,00E-54	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate</i> 074-AP-119-1-3_w0_1 10	MZ766785.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	36	495	84.06%	42%	4,00E-47	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate</i> 074-AP-119-1-3_w0_1 10	MZ766785.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	42	464	79.51%	42%	3,00E-29	<i>Retroviridae</i>	<i>HIV-1 isolate</i> 074-AP-119-1-3_w0_1 10	MZ766785.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	53	494	90.16%	12%	2,00E-10	<i>Microviridae.</i>	<i>Microviridae sp. isolate</i> CN7_L17_46	MT207125.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	55	477	90.48%	44%	2,00E-70	<i>Togaviridae;</i>	<i>Chikungunya virus</i> <i>isolate</i>	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	DNA	60	444	87.95%	18%	5,00E-16	<i>Inoviridae</i>	<i>Pseudomonas phage</i> SaPL	MH973725.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	1	1577	73.30%	65%	2,00E-89	<i>Caudoviricetes</i>	<i>Caudoviricetes sp.</i> <i>isolate</i> ctxsx2	BK037479.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	2	1279	80.23%	98%	0.0	<i>Bacteriófago</i>	<i>Bacteriophage sp.</i> <i>isolate</i> cttqH15	BK039054.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	5	1141	79.45%	94%	0,00	<i>Ackermannviridae</i>	<i>Dickeya phage</i> phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	8	910	81.50%	99%	0,00	<i>Ackermannviridae</i>	<i>Dickeya phage</i> phiDP10.3	KM209255.1

<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	10	894	93.66%	15%	1,00E-50	<i>Nairoviridae</i>	Orthonairovirus haemorrhagiae segment L	OR047175.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	13	865	83.97%	32%	2,00E-67	<i>Pospiviroidae</i>	Citrus exocortis viroid	OR024670.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	14	860	81.80%	96%	0,00E+00	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	15	857	82.48%	87%	0.0	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage	MZ092003.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	16	841	77.61%	93%	1,00E-128	<i>Caudoviricetes</i>	Moraxella phage	KR093640.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	17	840	75.00%	29%	5,00E-19	<i>Retroviridae</i>	Human endogenous retrovirus	U86698.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	19	828	87.50%	64%	3,00E-95	<i>Reovirales</i>	High Island virus S1	MF094128.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	21	795	88.27%	24%	2,00E-57	<i>Togaviridae.</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	22	791	80.60%	70%	2,00E-112	<i>Caudoviricetes</i>	Caudoviricetes sp. isolate ctxsx2	BK037479.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	23	770	80.36%	98%	1,00E-154	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage Pd_22F	MZ092003.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	26	735	86.38%	97%	0,00E+00	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	28	728	88.27%	35%	8,00E-81	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1

<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	29	727	93.33%	18%	7,00E-47	<i>Nairoviridae</i>	Orthonairovirus haemorrhagiae segment M	OR047155.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	30	723	81.11%	49%	6,00E-72	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage Pd_22F	MZ092003.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	31	714	88.89%	49%	8,00E-96	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	35	677	90.80%	75%	0,00E+00	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	37	660	81.62%	75%	9,00E-140	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	38	658	86.29%	75%	0.0	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	39	656	90.90%	99%	0.0	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	46	637	92.11%	92.11%	9,00E-135	<i>Retroviridae</i>	Myeloblastosis-associ ated virus type 2	L10924.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	47	632	89.92%	38%	5,00E-82	<i>Mitoviridae</i>	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus	MW454895.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	48	632	85.40%	50%	2,00E-86	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1

<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	50	625	80.00%	71%	5,00E-82	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage Pd_22F	MZ092003.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	52	622	86.36%	35%	3,00E-59	<i>Togaviridae;</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	53	616	76.81%	90%	1,00E-58	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	59	597	91.95%	14%	1e-23	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate 074-AP-119-1-3_w0_1 10	MZ766785.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	63	588	96.00%	12%	1e-23	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate 254Pt1-2015-P10E8	MK384503.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	65	585	88.68%	37%	1e-63	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate MRC022_	OR245970.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	69	582	90.23%	22%	1,00E-38	<i>Hypoviridae</i>	Trichoderma hypovirus	JX291540.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	73	568	84.97%	97%	6,00E-156	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage Pd_22F	MZ092003.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	75	566	77.17%	31%	2,00E-16	<i>Caudoviricetes</i>	Saccharomyces cerevisiae virus	MW174758.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	88	540	86.88%	96%	4,00E-162	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	89	540	83.12%	43%	2,00E-51	<i>Pospiviroidae</i>	Citrus exocortis viroid	LC758578.1

<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	94	535	90.22%	35%	3,00E-59	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	101	519	81.65%	80%	4,00E-162	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	102	519	85.12%	23%	1,00E-22	<i>Phenuiviridae</i>	Lihan tick virus	ON812284.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	109	504	81.43%	90%	5,00E-96	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	113	498	85.74%	97%	5,00E-141	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	115	491	88.99%	21%	2,00E-26	<i>Caudoviricetes</i>	Caudoviricetes sp. isolate ctxsx2,	BK037479.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	117	487	92.86%	11%	2e-11	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate 9255_GAG_AIM_H11	MT190419.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	118	486	98.22%	10%	3,00E-59	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	125	479	95.13%	97%	0.0	<i>Orthoherpesviridae</i>	Human gammaherpesvirus 4 isolate HKHD40	MH590409.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	127	478	88.32%	28%	7e-35	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate HK_JIDLNBL_S071	MT154980.1

<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	131	473	88.37%	18%	1,00E-17	<i>Caudoviricetes</i>	TPA: Caudoviricetes sp. isolate ctxsx2, partial genome	BK037479.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	132	473	82.86%	32%	1,00E-32	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	135	465	84.97%	96%	3,00E-156	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage Pd_22F	MZ092003.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	138	462	92.16%	11%	9e-09	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate 074-C-311-1-5_w96_4 91	MK458255.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	139	461	88.08%	32%	7e-40	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate HK_JIDLNBL_S071	MT154980.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	143	456	96.74%	93%	0.0	<i>Orthoherpesviridae</i>	Human gammaherpesvirus 4	MH590571.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	144	455	84.63%	84%	3,00E-156	<i>Caudoviricetes</i>	Paenibacillus phage Pd_22F	MZ092003.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	153	450	84.78%	93%	8,00E-114	<i>Ackermannviridae</i>	Dickeya phage phiDP10.3	KM209255.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	155	448	93.02%	9%	2e-05	<i>Retroviridae</i>	HIV-1 isolate MRC022	OR245970.1
<i>Ps. ferox</i> 2	RNA	161	441	92.88%	60%	8e-104	<i>Orthoherpesviridae</i>	Human gammaherpesvirus 4	MH590409.1

<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	166	438	98.22%	10%	3,00E-59	<i>Togaviridae;</i>	Chikungunya virus isolate	OL343610.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	167	436	87.93%	39%	1,00E-47	<i>Mitoviridae</i>	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus	MW454895.1
<i>Ps. ferox 2</i>	RNA	177	428	91.53%	13%	1,00E-11	<i>Narnaviridae.</i>	Narnaviridae sp. isolate 84-k141_21074	MZ680132.1