

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Genética, Ecologia e Evolução**  
**Programa de Pós-graduação em Genética**

Talita Émile Ribeiro Adelino

**VIGILÂNCIA GENÔMICA DA TRANSMISSÃO DE DENGUE E ZIKA NO BRASIL**

Belo Horizonte

2022

Talita Émile Ribeiro Adelino

## **VIGILÂNCIA GENÔMICA DA TRANSMISSÃO DE DENGUE E ZIKA NO BRASIL**

### **Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador: Luiz Carlos Júnior Alcantara

Coorientadora: Marta Giovanetti

Belo Horizonte

2022

043

Adelino, Talita Émile Ribeiro.

Vigilância genômica da transmissão de Dengue e Zika no Brasil [manuscrito]  
/ Talita Émile Ribeiro Adelino. – 2022.

133 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luiz Carlos Júnior Alcantara. Coorientadora: Marta Giovanetti.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto  
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genômica. 2. Dengue. 3. Infecção por Zika vírus. 4. Epidemias. 5.  
Vigilância. I. Alcantara, Luiz Carlos Júnior. II. Giovanetti, Marta. III. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação  
Instituto de Ciências Biológicas

**ATA DE DEFESA DE TESE**

<b>ATA DA DEFESA DE TESE</b>	<b>158/2022</b>
<b>Talita Émile Ribeiro Adelino</b>	<b>Entrada 1º/2018</b> <b>CPF: 087.424.336-06</b>

Às quatorze horas do dia **11 de julho de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Vigilância genômica da transmissão de dengue e zika no Brasil**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Luiz Carlos Júnior Alcântara**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>CPF</b>	<b>Indicação</b>
Luiz Carlos Júnior Alcântara	FIOCRUZ - RJ	576.261.896-04	APROVADA
Evanguedes Kalapothakis	UFMG	494.307.426-04	APROVADA
Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis	UFMG	060.508.396-70	APROVADA
Sérgio Caldas	FUNED	087.897.507-13	APROVADA
Luciano Andrade Moreira	FIOCRUZ -MG	086.220.638-36	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**



O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 11 de julho de 2022.**

Luiz Carlos Júnior Alcântara - Orientador

Evanguedes Kalapothakis

Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Sérgio Caldas

Luciano Andrade Moreira



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Junior Alcantara, Usuário Externo**, em 08/07/2022, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Professora do Magistério Superior**, em 12/07/2022, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Andrade Moreira, Usuário Externo**, em 12/07/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Caldas, Usuário Externo**, em 12/07/2022, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Presidente**, em 18/07/2022, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1583659** e o código CRC **6874C9E4**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação  
Instituto de Ciências Biológicas

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"Vigilância genômica da transmissão de dengue e zika no Brasil"**

**Talita Émile Ribeiro Adelino**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Luiz Carlos Júnior Alcântara - Orientador  
FIOCRUZ - RJ

Evanguedes Kalapothakis  
UFMG

Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis  
UFMG

Sérgio Caldas  
FUNED

Luciano Andrade Moreira  
FIOCRUZ -MG

Belo Horizonte, 11 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Junior Alcantara, Usuário Externo**, em 08/07/2022, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis, Professora do Magistério Superior**, em 12/07/2022, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento



no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Andrade Moreira, Usuário Externo**, em 12/07/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Caldas, Usuário Externo**, em 12/07/2022, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Presidente**, em 18/07/2022, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1584537** e o código CRC **7ACF9FB9**.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida, pela força concedida para superar todos os obstáculos e por me proporcionar a alegria de chegar até aqui.

Aos meus pais, Carlos e Maria José, e ao meu irmão, Thales, meus maiores incentivadores. Agradeço pelo amor incondicional, apoio e paciência. Vocês são meu porto seguro! Amo vocês! Agradeço também ao vô Tarcísio, vó Carmita e vó Lili, meus exemplos de vida; e a todos os familiares, pelos momentos felizes. Aos meus priminhos, Bernardo, Íris Liz e Benício, por tornarem meus dias mais leves e divertidos.

Aos meus orientadores, Luiz Alcantara e Marta Giovanetti, por me receberem tão bem no grupo e pelas inúmeras oportunidades que me proporcionaram ao longo desses quatro anos. Agradeço também pelos ensinamentos, amizade, confiança, incentivo e exemplo de profissionalismo.

À toda equipe do nosso grupo de pesquisa, pela parceria, discussões enriquecedoras e pelas contribuições para o desenvolvimento desse projeto. Agradeço, em especial, à Marta, Joilson e Vagner por todo carinho, amizade, momentos descontraídos, incentivo, conselhos, aprendizados e por confiarem e acreditarem no meu trabalho nos momentos em que eu mesma duvidava (e não foram poucos!). Vocês tornaram esses quatro anos muito mais leves! Meus “Achados e Perdidos”, muito obrigada por tudo!

À Fundação Ezequiel Dias (Funed), por apoiar e permitir meu crescimento pessoal e profissional e à busca constante por conhecimento. Agradeço também aos amigos da Virologia, pelo acolhimento, apoio e pela convivência prazerosa ao longo desses oito anos de trabalho. Em especial, agradeço aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular - Felipe, Alana, Clara, Adriana, Ludmila, Natália, Cris, André, Antônio, Kelly - que dividiram comigo todos os momentos difíceis e as alegrias dessa caminhada. Muito obrigada pela amizade, companheirismo, apoio, confiança, conselhos, ensinamentos e momentos divertidos. Passamos por muitos desafios ao longo desses anos, principalmente durante a pandemia da COVID-19, e vocês foram essenciais, tornando essa jornada mais tranquila e menos traumatizante.

Aos amigos de Entre Rios, que estiveram comigo durante todo o tempo. Agradeço pelo carinho, amizade, companheirismo e incentivo.

À Dra. Sandra Doné, por me ouvir há sete anos e por estar ao meu lado nos momentos mais críticos. Agradeço pelas palavras de conforto, de incentivo e também pelos puxões de orelha. Seu apoio foi fundamental nesse período! Muito obrigada por me mostrar e por me fazer acreditar que tudo posso!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética, pelo aprendizado e auxílios.

Aos membros da banca de qualificação e da defesa, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

## RESUMO

Os arbovírus transmitidos por mosquitos são considerados importantes desafios para a saúde pública no Brasil, principalmente nos últimos anos, onde o cenário epidemiológico tem sido marcado pela cocirculação de diferentes arbovírus, incluindo os vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV). Apesar disso, pouco ainda é conhecido sobre a diversidade genética e a dinâmica da transmissão desses vírus no nosso país. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar o monitoramento genômico de DENV (sorotipos DENV1 e DENV2) e ZIKV no Brasil durante as últimas epidemias desses vírus. Para isso, foram gerados 250 novos genomas completos ou quase completos (DENV1=57, DENV2=170 e ZIKV=23) que foram combinados com informações epidemiológicas para melhor compreender as epidemias causadas por esses arbovírus. Os resultados deste estudo forneceram uma avaliação abrangente das últimas epidemias de dengue e Zika entre as regiões brasileiras e destacaram a importância dos esforços contínuos de vigilância para melhor compreender as epidemias de arbovírus no país.

Palavras-chave: Dengue. Zika. Epidemia. Vigilância Genômica.

## **ABSTRACT**

Mosquito-borne arboviruses are considered important challenges for public health in Brazil, especially in recent years, where the epidemiological scenario has been marked by the co-circulation of different arboviruses, including dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) and yellow fever (YFV). Despite this, there is a paucity of updated data on these viruses genetic diversity and transmission dynamics in Brazil. Therefore, the aim of this work was to carry out genomic monitoring of DENV (DENV1 and DENV2 serotypes) and ZIKV during the recent epidemics of these viruses in Brazil. For this, were generated 250 complete or near-complete viral genomes (DENV1=57, DENV2=170 and ZIKV=23) and combined with epidemiological information for more contextual data about these viruses. The results of this study provided a comprehensive assessment of the recent dengue and Zika epidemics across Brazilian regions and highlighted the importance of ongoing surveillance efforts to better understand arbovirus epidemics in the country.

Keywords: Dengue. Zika. Outbreak. Genomic Surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação do genoma dos flavivírus .....	17
Figura 2- Representação do ciclo de replicação dos flavivírus .....	19
Figura 3- Ciclo de transmissão de DENV .....	23
Figura 4- Áreas em risco de dengue, 2021 .....	28
Figura 5- Número de casos notificados de dengue no Brasil, 1980-2021 .....	30
Figura 6- Reconstrução filogenética de ZIKV .....	31
Figura 7- Casos de infecção por ZIKV no Brasil, 2016 .....	36
Figure S1- Patterns of serotype dominance 2015-2020 .....	78
Figure S2- Maps of yearly incidence of dengue in Brazil, 2015-2020 .....	79
Figure S3- Mosquito-borne viral suitability measure (index P) .....	80
Figure S4- Weekly notified dengue cases normalized per 100K individuals per region in 2015-2020 (until EW06) .....	81
Figure S5- DENV mortality in Brazil, 2015-2019 .....	82
Figure S6- Analysis of temporal structure in DENV1 genotype V clades I-III ...	83
Figure S7- Genetic divergence regressed against date of sample collection for the BR-4 clade of DENV2 ( $n=181$ ) .....	84
Figure S8- Number of complete DENV1 and DENV2 genomes sequences from Brazil, 1988-2020 .....	85
Figure S9- Timeline of the ZIBRA2 itinerant project across the Brazilian Midwest region .....	86



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos genótipos de DENV e distribuição geográfica .....	21
Table S1- Number of molecularly confirmed DENV cases in the three Brazilian macro regions, 2015-2020 .....	87
Table S2- Information on the 227 sequenced samples of DENV1 and DENV2.	88
Table S3- Sequencing statistics for the 227 DENV1 and DENV2 sequences generated in this study .....	96
Table S4- Genetic signatures for BR-4 lineages I and II .....	103
Table S5- Primers for sequencing the complete genomes of DENV1 and DENV2 .....	105
Table S6- Members of Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Potencialização dependente de anticorpos, do inglês <i>Antibody-Dependent Enhancement</i>
Ae.	Gênero <i>Aedes</i>
BR-4L1	Linhagem 1 do clado BR-4
BR-4L2	Linhagem 2 do clado BR-4
C	Gene e proteína do capsídeo
CHIKV	Chikungunya vírus
COVID-19	Doença causada pelo novo coronavírus, do inglês <i>Coronavirus disease 2019</i>
DENV	Dengue vírus
DENV1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV2	Dengue vírus sorotipo 2
DENV3	Dengue vírus sorotipo 3
DENV4	Dengue vírus sorotipo 4
E	Gene e proteína envelope
ECSA	Genótipo <i>East-Central South African</i> do vírus chikungunya
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Quilobase
M	Proteína da membrana
NCR	Região não codificante
NS1	Gene e proteína não-estrutural NS1
NS2A	Gene e proteína não-estrutural NS2A
NS2B	Gene e proteína não-estrutural NS2B
NS3	Gene e proteína não-estrutural NS3
NS4A	Gene e proteína não-estrutural NS4A
NS4B	Gene e proteína não-estrutural NS4B
NS5	Gene e proteína não-estrutural NS5
ORF	Janela aberta de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

prM	Gene e proteína pré-membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição Reversa acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase
SARS-CoV-2	Novo coronavírus, do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SE	Semana Epidemiológica
SGB	Síndrome de Guillain–Barré
tMRCA	Ancestral comum mais recente
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
YFV	Febre amarela vírus
ZIKV	Zika vírus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Flavivírus</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Dengue</b> .....	<b>20</b>
1.2.1 O dengue vírus .....	20
1.2.2 Ciclos de transmissão .....	22
1.2.3 A doença .....	24
1.2.4 Origem e epidemiologia .....	26
<b>1.3 Zika</b> .....	<b>30</b>
1.3.1 O vírus Zika .....	30
1.3.2 Ciclos de transmissão .....	32
1.3.3 A doença .....	32
1.3.4 Origem e epidemiologia .....	34
<b>1.4 Justificativa</b> .....	<b>36</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral .....	39
2.2 Objetivos específicos .....	39
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 Vigilância genômica da transmissão de DENV1 e DENV2 no Brasil ....	40
3.2 Vigilância genômica da transmissão de ZIKV na região centro-oeste do Brasil .....	53
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>68</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>78</b>
<b>APÊNDICE A - Material suplementar do artigo “Field and classroom</b>	

<i>initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil</i> .....	78
<b>APÊNDICE B - Material suplementar do artigo “A Retrospective Overview of Zika Virus Evolution in the Midwest of Brazil”</b> .....	126
<b>APÊNDICE C - Outros artigos publicados durante o doutorado</b> .....	128

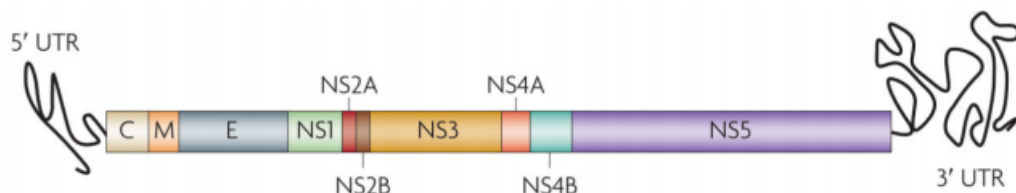
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Flavivírus

O gênero *Flavivirus* pertence à família *Flaviviridae*, um grupo de pequenos vírus esféricos com aproximadamente 50 nm de diâmetro que replicam no citoplasma da célula hospedeira (GEROLD et al, 2017). Eles são encontrados em artrópodes, principalmente carrapatos e mosquitos, e podem ocasionalmente infectar os humanos.

Todos os membros desse gênero compartilham características estruturais e funcionais semelhantes. O genoma é cercado por um capsídeo proteico que, por sua vez, é envolto por um envelope lipídico contendo proteínas virais e do hospedeiro (RICE et al, 1985; CHAMBERS et al, 1990; LINDENBACH et al, 2013). O genoma viral é formado por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, não segmentado e de polaridade positiva com cerca 11 kb de tamanho. Ele possui uma única *open reading frame* (ORF) de aproximadamente 3.400 códon flanqueada por duas regiões não codificantes (5' e 3' NCRs), importantes nos processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento (SHURTLEFF et al, 2001; LINDENBACH et al, 2013).

A única ORF dos flavivírus codifica uma poliproteína que é processada posteriormente por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais (capsídeo [C], pré-membrana [prM] e envelope [E]) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1) (CHAMBERS et al, 1990; RICE et al, 1985; BOLLATI et al, 2010; LINDENBACH et al, 2013).



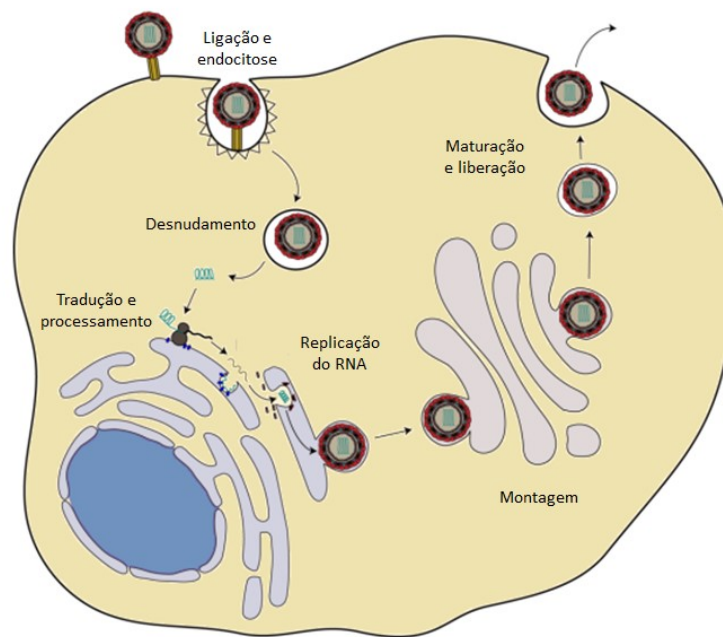
**Figura 1. Representação do genoma dos flavivírus.** A única *open reading frame* do genoma é flanqueada pelas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR) e codifica três proteínas estruturais (capsídeo [C], membrana [M] e envelope [E]) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: GUZMAN et al. (2010).

A proteína C é a principal componente estrutural do capsídeo dos flavivírus e é indispensável para a montagem das partículas virais. A proteína M é formada a partir da clivagem de sua precursora prM durante a maturação de novas partículas virais e está envolvida no aumento da infectividade do vírus e na organização da estrutura viral. A proteína E, por sua vez, é a maior constituinte da superfície e está ancorada no envelope lipídico dos vírions maduros, mediando a adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira, além de participar da indução da resposta imune do hospedeiro (LINDENBACH et al, 2013).

As proteínas não-estruturais dos flavivírus também desempenham importantes funções. A proteína NS1 pode ser encontrada no interior das células infectadas, associadas à membrana celular ou na forma secretada. Ela atua como cofator no processo da replicação do RNA viral, além de estar envolvida na ativação da resposta imune do hospedeiro. A proteína NS2A participa do processo de montagem da partícula viral e também do complexo de replicação do RNA viral, enquanto a proteína NS2B forma um complexo estável com NS3, atuando como cofator para a protease NS2B-NS3. NS3, por sua vez, é multifuncional, participando tanto do processamento da poliproteína como da replicação do RNA viral. Sua extremidade N-terminal forma o complexo serina protease juntamente com NS2B, que estão envolvidos no processamento da poliproteína. A porção C-terminal de NS3 contém um domínio RNA helicase envolvido na replicação do RNA. NS4A e NS4B parecem estar envolvidas na replicação do RNA. A proteína NS5, a maior e mais conservada proteína dos flavivírus, possui atividade de metiltransferase e está envolvida na metilação do *cap* viral, além de atuar como uma RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação do genoma viral (LINDENBACH et al, 2013).

Assim como os demais vírus, os flavivírus necessitam de uma célula hospedeira para completarem seu ciclo de multiplicação e formar novas partículas virais. Esse ciclo envolve os processos de: a) adsorção, quando as proteínas do envelope viral se ligam a receptores das células hospedeiras; b) penetração, quando a partícula viral é internalizada por endocitose mediada pela fusão do envelope viral com a membrana celular; c) desnudamento, quando ocorre a liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira através do desnudamento do nucleocapsídeo; d) transcrição/tradução/replicação, quando o RNA viral é replicado e, ao mesmo tempo,

traduzido em uma única poliproteína que é posteriormente processada por proteases virais e da célula hospedeira; e) montagem e liberação, quando as proteínas e o genoma viral, juntamente com a membrana da célula hospedeira, formam novas partículas virais imaturas. Essas partículas são clivadas por proteases, tornando-se maduras e infectantes, e posteriormente são liberadas através da via secretora do hospedeiro (CLYDE et al, 2006; LINDENBACH et al, 2013) (Figura 2).



**Figura 2. Representação do ciclo de multiplicação dos flavivírus.** Os flavivírus multiplicam dentro da célula hospedeira em um ciclo que envolve as fases de adsorção, penetração, desnudamento, transcrição/tradução/replicação, montagem e liberação. Fonte: Adaptado de GEROLD et al. (2017).

O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 50 espécies virais que podem causar uma variedade de doenças, incluindo encefalites e febre hemorrágica. Ele é formado por três grupos distintos: os vírus cujos vetores ainda permanecem desconhecidos (vírus Modoc e vírus Rio Bravo), os vírus transmitidos por carrapatos (vírus da encefalite transmitida por carrapato e vírus da febre hemorrágica de Omsk) e os vírus transmitidos por mosquitos (LINDENBACH et al, 2013). Nesse último grupo estão incluídos vírus de preocupação mundial, como os vírus da dengue, da febre amarela e da Zika, que tem causado grandes epidemias ao longo dos últimos anos.



## 1.2 Dengue

### 1.2.1 O dengue vírus

O dengue vírus (DENV), membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, é o agente causador da dengue, uma doença febril aguda que coloca em risco quase metade da população mundial (CDC, 2021). DENV inclui quatro sorotipos geneticamente relacionados e antígenicamente diferentes (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), de forma que a infecção por um sorotipo gera imunidade duradoura contra ele, podendo um mesmo paciente ser infectado pelos outros sorotipos ao longo de sua vida (RICE et al, 1985; CHAMBERS et al, 1990).

Os quatro sorotipos de DENV compartilham aproximadamente 65% de seu genoma (GUZMAN et al, 2010), que é formado por RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb de tamanho. Eles foram inicialmente distinguidos por neutralização cruzada e inibição da hemaglutinação, utilizando soro de pacientes infectados. As primeiras evidências das diferenças genéticas foram identificadas pelo uso da técnica de RNA *fingerprint*, em que o número e tamanho dos fragmentos gerados após a digestão da fita de RNA variava de acordo com a sequência nucleotídica do vírus. Posteriormente, com o surgimento e avanço das técnicas de sequenciamento, foi possível confirmar a homologia entre os sorotipos bem como a natureza conservada da organização genética. Baseado no sequenciamento do gene E, foi demonstrado que os quatro sorotipos de DENV compartilham de 60 a 70% da sequência de aminoácidos e que, dentro de um mesmo sorotipo, essa homologia é maior, com níveis de conservação acima de 90% (PIERSON e DIAMOND, 2013).

A RNA polimerase dependente de RNA codificada pelo genoma viral parece ser a principal responsável por essa variabilidade. Por não possuir atividade de correção de erro, ela gera altas taxas de substituição de nucleotídeos, rápida divergência e alta diversidade genética intra-sorotipo (TWIDDY et al, 2003; CHEN e VASILAKIS, 2011), permitindo que cada sorotipo seja dividido em genótipos (RICO-HESSE, 1990; VASILAKIS e WEAVER, 2008; CHEN e VASILAKIS, 2011). O termo “genótipo” foi definido por Rico-Hesse (1990) como o agrupamento de DENV com

divergência na sequência de nucleotídeos não superior a 6% em uma determinada região do genoma.

Globalmente, os sorotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 são divididos em 19 genótipos, que podem ter diferentes distribuições espaço-temporais (Tabela 1), e cada genótipo pode ser subdividido em múltiplas linhagens (FONSECA et al, 2019; HARAPAN et al, 2020).

Tabela 1 – Classificação dos genótipos de DENV e distribuição geográfica

SOROTIPO	GENÓTIPO	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
<b>DENV1</b>	I	Isolados do Sudeste da Asiático, China e Leste da África
	II	Isolados da Tailândia (1950-1960)
	III	Isolado silvestre da Malásia
	IV	Isolados das Ilhas do Oeste do Pacífico e da Austrália
	V	Isolados das Américas, Oeste da África e algumas isolados da Ásia
<b>DENV2</b>	Asiático I	Isolados da Malásia e Tailândia
	Asiático II	Isolados do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Isolados da Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Oceano Índico e Pacífico, Subcontinente Indiano e do Oriente Médio
	Americano	Isolados da América Latina e isolados mais antigos do Caribe, Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico (1950-1960)
	Asiático/Americano	Isolados da Tailândia e Vietnã e isolados coletados nas Américas
	Silvestre	Isolados coletadas de humanos, mosquitos silvestres e primatas sentinelas no Oeste da África e Sudeste da Ásia
<b>DENV3</b>	I	Isolados da Indonésia, Malásia, Filipinas e isolados recentes das Ilhas do Pacífico Sul
	II	Isolados da Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Isolados do Sri Lanka, Índia, África, Samoa e um isolado da Tailândia (1962)
	IV	Isolados de Porto Rico, América Central, América Latina e um isolado de Taiti (1965)
<b>DENV4</b>	I	Isolados da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Isolados da Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Isolados da Tailândia (1997-2001)
	IV	Isolados silvestres da Malásia

Fonte: HARAPAN et al (2020)

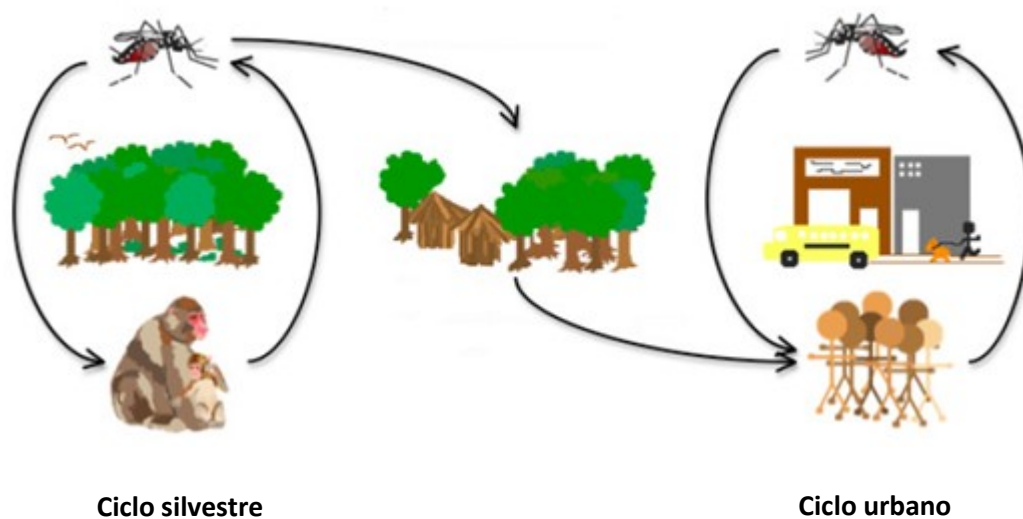
Uma característica bem documentada para todos os sorotipos de DENV é o *turnover* de genótipos e linhagens, que ocorre quando um genótipo ou linhagem particular emerge ou persiste por um período de tempo em uma determinada região geográfica, sendo posteriormente extinto ou substituído por um genótipo ou linhagem totalmente diferente. Esse fenômeno pode ser causado por um processo

estocástico ou pode surgir devido a variações no *fitness* de DENV (CHOUDHURY et al, 2014; HARAPAN et al, 2020).

O *turnover* tem importantes implicações para a epidemiologia e o controle da dengue. A introdução de novos genótipos ou linhagens de DENV em populações susceptíveis tem o potencial de causar grandes epidemias assim como influenciar a busca por vacinas, já que as propriedades antigênicas podem ser bastante diferentes entre genótipos e linhagens (CHOUDHURY et al, 2014).

### 1.2.2 Ciclos de transmissão

Os DENV são mantidos em dois ciclos de transmissão distintos, classificados como silvestre e urbano (Figura 3). O ciclo silvestre ocorre principalmente nas áreas de floresta da África e Ásia, envolvendo primatas não-humanos como reservatórios para amplificação viral e mosquitos arbóreos do gênero *Aedes* como vetores. Entretanto, alguns vetores, mesmo arborícolas, são conhecidos por descerem ao nível do solo para se alimentarem de humanos, facilitando a transferência de DENV silvestre das florestas para os ambientes peridomésticos. Na África, o ciclo silvestre é mantido pelos mosquitos vetores *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* e *Ae. taylori* e incluem como principais reservatórios os primatas *Erythrocebus patas* (macaco patas), *Chlorocebus sabaes* (macaco verde), *Papio papio* (babuíno guiné). Já na Ásia, os principais vetores incluem os mosquitos *Ae. pseudoniveus*, *Ae. subniveus*, *Ae. vanus*, *Ae. albolateralis*, *Ae. niveoides* e *Ae. novoniveus*, sendo os primatas *Macaca fascicularis* (macaco cinomolgo), *Macaca nemestrina* (macaco-de-cauda-de-porco-do-sul), *Presbytis cristata* (macaco-folha-prateado) e *Presbytis melaphos* (macaco-folha-verde) os principais reservatórios (CHEN e VASILAKIS, 2011). Atualmente, quase todas as infecções humanas são ocasionadas pelos DENV circulando exclusivamente nos ambientes domésticos e peridomésticos, nos quais os humanos atuam como reservatórios e hospedeiros para amplificação. Neste ciclo, conhecido como ciclo urbano, os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são os principais vetores (WHITEHEAD et al, 2007; CHEN e VASILAKIS, 2011).



**Figura 3. Ciclo de transmissão de DENV.** O ciclo silvestre envolve transmissão entre primatas não-humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, enquanto o ciclo urbano envolve transmissão do vírus aos humanos principalmente por mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Fonte: Adaptado de CHEN e VASILAKIS (2011).

Depois de se alimentar de uma pessoa infectada, o vírus se replica no intestino do mosquito antes de se disseminar para os tecidos secundários, incluindo as glândulas salivares. O período de tempo entre a ingestão do vírus e a transmissão efetiva para um novo hospedeiro é denominado período de incubação extrínseco e pode variar de 8 a 12 dias (GUBLER, 2006). As variações no período de incubação extrínseco podem ser influenciadas pela temperatura ambiente e a magnitude de flutuações diárias, pelo genótipo do vírus e pela concentração viral inicial. Uma vez infeccioso, o mosquito é capaz de transmitir o vírus pelo resto da vida. Após uma pessoa ter sido picada pela fêmea infectada, o vírus passa por um período de incubação intrínseco, que varia de 3 a 14 dias, após o qual a pessoa pode iniciar um quadro de infecção aguda, com febre e outros sintomas inespecíficos. Durante esse período febril, que pode durar de 2 a 10 dias, os DENV podem ser encontrados circulando no sangue periférico. Devido à alta viremia das infecções, hoje em dia os DENV são transmitidos eficientemente entre mosquitos e humanos sem a necessidade de ocorrência do ciclo silvestre para amplificação (WHITEHEAD et al, 2007).

Apesar de bastante controverso, outro mecanismo que parece desempenhar um papel importante na manutenção de DENV na natureza é a transmissão transovariana. Esse fenômeno é especialmente importante quando condições

desfavoráveis limitam a transmissão horizontal, como períodos de seca e períodos interepidêmicos, onde a população de hospedeiros vertebrados susceptíveis e não imunes é baixa (VASILAKIS e WEAVER, 2008).

### 1.2.3 A doença

A infecção por DENV causa em humanos um amplo espectro de manifestações clínicas. A maior parte das pessoas infectadas podem apresentar um quadro assintomático ou aulo-limitado, caracterizado por febre, mialgia, artralgia, *rash* maculopapular, dor retro-orbital e leucopenia (classificado como dengue com ou sem sinais de alarmes). Entretanto, alguns pacientes podem apresentar doença grave, potencialmente fatal e com quadros hemorrágicos, classificadas dengue grave (GUBLER, 1998; RIGAU-PEREZ et al, 1998).

Os casos graves são caracterizados por extravasamento capilar acompanhado de trombocitopenia e dano hepático de leve a moderado, refletido pelo aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas. As formas graves geralmente ocorrem como uma segunda fase da doença, após um curto período de diminuição do quadro febril. Alguns pacientes podem desenvolver manifestações hemorrágicas, incluindo petéquias, epistaxe, sangramento gastrointestinal e menorragia. Embora graves, o choque, caracterizado por hemoconcentração e hipotensão, permanece como o principal risco de mortalidade (PIERSON e DIAMOND, 2013).

Os fatores determinantes para o desenvolvimento das formas graves da doença ainda não são totalmente entendidos. Vários fatores relacionados ao hospedeiro têm sido propostos para explicar os casos de dengue grave, como resposta imune, anormalidades de coagulação, predisposição genética, fatores nutricionais, sexo e idade dos pacientes. Um dos mecanismos mais estudado é a “potencialização dependente de anticorpos” (*antibody-dependent enhancement*, ADE), em que os anticorpos pré-existent da infecção primária respondem de forma subneutralizante às partículas virais da infecção secundária, causada por um sorotipo diferente. Na ADE, esses anticorpos formam complexos com o DENV infectante, resultando no aumento da internalização e replicação dos vírus nas células fagocitárias (HALSTEAD et al, 1970; HALSTEAD e O’ROURKE, 1977).

Sorotipos e/ou genótipos específicos também têm sido apontados como indicadores da virulência de DENV. Apesar dessa correlação não ser totalmente estabelecida, estudos epidemiológicos e filogenéticos sugerem que alguns genótipos asiáticos de DENV2 são mais virulentos que o genótipo americano (LEITMEYER et al, 1999; HARRIS et al, 2000) assim como o genótipo III de DENV3 tem sido associado às epidemias de dengue grave na Índia, África e América Latina (MESSER et al, 2003).

O diagnóstico laboratorial da dengue é considerado complexo devido à semelhança clínica com outras arboviroses, dificuldade de acesso aos laboratórios de referência para um diagnóstico molecular e/ou sorológico diferencial e existência de reações sorológicas cruzadas (KUTSUNA et al, 2014; HENNESSEY et al, 2016; CHEN, 2016). Ele pode ser realizado por métodos classificados como diretos e indiretos, de acordo com o intervalo entre início dos sintomas e coleta da amostra biológica. Os métodos diretos são aqueles realizados durante a fase virêmica da doença, objetivando a detecção do vírus, do seu material genético ou de antígenos virais. Entre os métodos preconizados pelo Ministério da Saúde, destacam-se o isolamento viral, Transcrição Reversa acoplada à Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), pesquisa da proteína NS1 e pesquisa de antígenos virais por imunohistoquímica. Já os métodos indiretos são aqueles realizados após a fase virêmica da doença, objetivando a pesquisa de anticorpos IgM e IgG específicos contra os DENV, teste de neutralização por redução de placa (PRNT) e inibição da hemaglutinação (WHO, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a).

Atualmente não existe tratamento antiviral específico para pessoas infectadas por DENV, sendo este considerado apenas suportivo e sintomático, com uso de analgésicos, antitérmicos e hidratação oral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a; WHO, 2021). Apesar de existirem diversos estudos e candidatos em desenvolvimento, também não está disponível uma vacina segura e eficaz para prevenção da doença. Para ser efetiva, a vacina deve proteger contra os quatro sorotipos de DENV, ser segura para aplicação em crianças, ser econômica e ainda promover imunidade protetora de longa duração (GUBLER, 2006). Por causa desses fatores agravantes, as medidas para controle do vetor continuam sendo a principal estratégia para prevenção da doença.

#### 1.2.4 Origem e epidemiologia

A origem geográfica de DENV não está totalmente elucidada e ainda não é possível concluir com os dados disponíveis atualmente se ela aconteceu no continente africano ou asiático. Os estudos que apontam para a origem na África são baseados principalmente nas evidências da circulação de outros flavivírus na região e também na origem africana do mosquito *Ae. aegypti*, o principal vetor da doença. Entretanto, a circulação dos quatro sorotipos silvestres de DENV no sudeste da Ásia e o registro da circulação apenas de DENV2 silvestre na África, apontam para a origem asiática do vírus (revisado por VASILAKIS e WEAVER, 2008; CHEN e VASILAKIS, 2011).

Os primeiros registros de uma doença afetando humanos semelhante à dengue foram feitos durante a dinastia chinesa, seguido de registros do século XVII e XVIII, descrevendo uma doença com ampla distribuição geográfica favorecida pelo tráfico de escravos (VASILAKIS e WEAVER, 2008). A primeira descrição de uma epidemia semelhante a dengue ocorreu em 1780, na Filadélfia, por Benjamim Rush (RIGAU-PÉREZ, 2006) e se tornou comum na América do Norte, América do Sul, Caribe, Ásia e Austrália nos séculos XVIII e XIX (RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013). Entretanto, a descrição dessas epidemias foi baseada em fatores clínicos e epidemiológicos, o que dificultou a confirmação do agente responsável, à medida que outros vírus com características clínicas semelhantes poderiam estar envolvidos nessas epidemias (DICK et al, 2012).

Foi em 1906 que Bancroft descreveu pela primeira vez os mosquitos *Ae. aegypti* como responsáveis pela transmissão de DENV. As primeiras cepas de DENV1 e DENV2 foram isoladas durante a Segunda Guerra Mundial, por pesquisadores japoneses (HOTTA, 1952) e americanos (SABIN, 1952), enquanto os sorotipos DENV3 e DENV4 foram isolados anos mais tarde, em 1956, nas Filipinas (HAMMON et al, 1960).

Nas Américas, as epidemias de dengue durante as décadas de 1950 a 1970 foram raras, devido ao sucesso de uma campanha de erradicação do mosquito *Ae. aegypti* e combate à febre amarela, coordenada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 1947). Entretanto, essa campanha foi interrompida no início da

década de 70, quando foi observada uma intensa migração do mosquito da região do Caribe para a América do Sul (PINHEIRO e CORBER, 1997).

Antes de 1977, somente DENV2 e DENV3 estavam presentes no continente americano. O sorotipo DENV3 causou a primeira epidemia em 1963 na Jamaica e Porto Rico, enquanto DENV2 foi responsável por epidemias em 1969 e 1970. Durante esse período, uma característica da dengue nas Américas foi a hipoendemicidade, onde um único sorotipo estava presente na maioria dos países (WILSON e CHEN, 2002; GUBLER, 2014).

Em 1977, DENV1 foi introduzido nas Américas a partir do continente asiático, causando epidemias na Jamaica e Cuba e, em 1978, em Porto Rico e Venezuela. Nos anos seguintes, esse sorotipo se dispersou por todo Caribe, México, Texas, América Central e região norte da América do Sul. Em 1981, DENV4 foi introduzido nas ilhas do Caribe e, assim como DENV1, rapidamente se espalhou para o México, América Central e América do Sul. Com a introdução de DENV4, a dengue que até então havia sido identificada como a forma clássica, teve seus primeiros casos de graves descritos nessa região (WILSON e CHEN, 2002; GUBLER, 2014).

Ainda em 1981, Cuba registrou a primeira epidemia de dengue grave nas Américas. Durante essa epidemia, DENV2 causou cerca de 344 mil casos de dengue, sendo 10 mil deles classificados como casos graves. Outra grande epidemia de dengue grave aconteceu na Venezuela entre os anos de 1989 e 1990, onde foram registrados mais de 6 mil casos e 73 óbitos. Embora não tenha sido possível identificar o principal sorotipo responsável, DENV2 se mostrou mais frequentemente associado aos casos fatais (GUBLER, 2014). Os eventos de introdução de novos sorotipos de DENV e a mudança da epidemiologia da doença nas Américas entre os anos de 1970 e 1980, combinado com a reinfestação pelo *Ae. aegypti*, o aumento da urbanização e o movimento de pessoas, fez com que a maioria dos países se tornassem hiperendêmicos para dengue. Além desses fatores, a falha dos programas de combate ao vetor, o crescimento populacional, a globalização da economia e as alterações climáticas também contribuíram para a dengue expandir em escala mundial (SAN MARTIN et al, 2010; CHEN e VASILAKIS, 2011). A doença, que antes era restrita a países tropicais, passou a atingir novas áreas e vem causando surtos explosivos na Europa, como aquele registrado em 2012 nas ilhas Madeira, em Portugal. Durante esse surto, foram registradas mais de



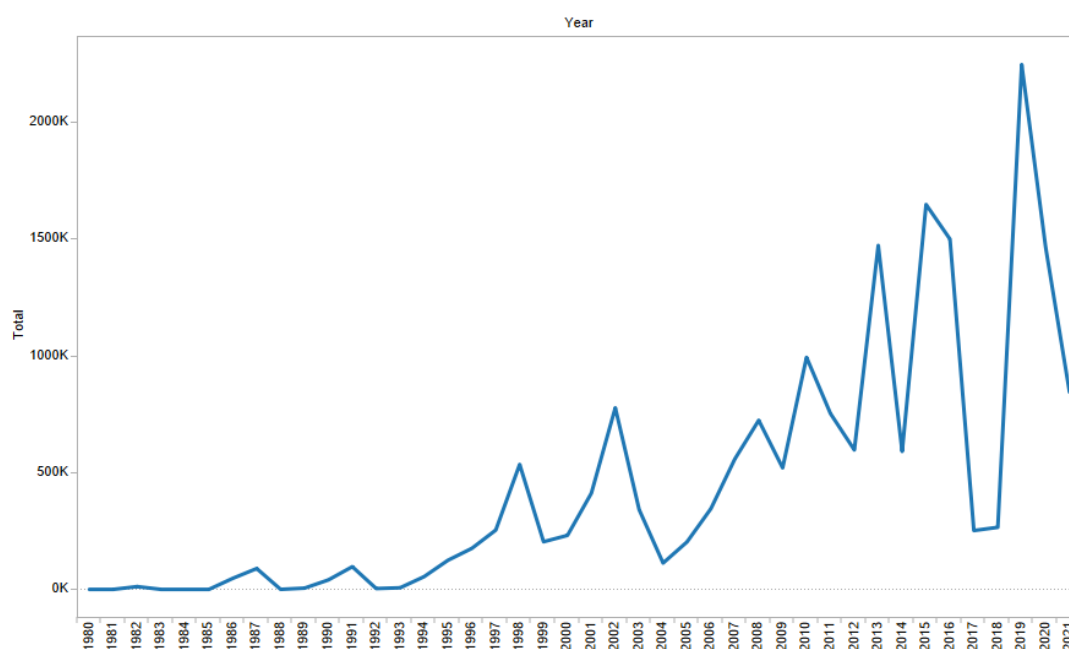


estados do Ceará, Alagoas e Pernambuco (SOUZA et al, 1995; TEIXEIRA et al, 2009). Ainda com condições ambientais favoráveis à circulação de DENV, em 1990, foi registrado a introdução do sorotipo DENV2, também no estado do Rio de Janeiro, onde foram descritos os primeiros casos graves (NOGUEIRA et al, 1990). Ainda no Rio de Janeiro, nos anos 2000, o sorotipo DENV3 foi introduzido em território brasileiro (NOGUEIRA et al, 2001). Desde então, o Brasil é considerado uma região hiperendêmica para dengue, registrando os maiores números de casos no mundo, com aproximadamente 18 milhões de infecções notificadas desde 1980 (OPAS, 2021).

Diferentes sorotipos de DENV causaram grandes epidemias no Brasil nos últimos 20 anos, sendo 2002, 2008 (predominância de DENV2), 2010 (predominância de DENV1), 2013 (predominância de DENV1 e DENV4), 2015 (predominância de DENV1) e 2016 (predominância de DENV1) os anos mais epidêmicos e as regiões centro-oeste e sudeste, aquelas com maior número de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b) (Figura 5). Em relação aos casos graves de dengue, de 2003 a 2013, o Brasil confirmou 89.265 casos, sendo 77% classificados como dengue com complicações e cerca de 23% classificados como dengue grave. No período de 2014 a abril de 2019, quando a nova classificação de casos graves da OMS foi adotada no país, foram confirmados 55.615 casos, sendo 51.195 casos de dengue com sinais de alarme e 4.420 casos de dengue grave (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b).

Em 2019, após quase uma década de baixa circulação no país e impulsionado por padrões climáticos cada vez mais extremos, as autoridades de saúde registraram a reemergência do DENV2 no Brasil (Figura 5), com um total de 1.544.987 casos prováveis e 782 óbitos confirmados até a semana epidemiológica 52 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). A distribuição geográfica dos casos notificados nesse período atingiu todas as regiões territoriais do Brasil, com as maiores incidências registradas nas regiões centro-oeste (1.349,1 casos por 100.000 habitantes), sudeste (1.159,4 casos por 100.000 habitantes) e nordeste do país (376,7 casos por 100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). Mesmo com uma longa história de circulação de DENV e experiência recente com grandes epidemias de outros arbovírus, como

ZIKV, CHIKV e YFV, o Brasil continua a enfrentar dificuldades na implantação de medidas eficazes para controle da doença e dos mosquitos vetores.



**Figura 5. Número de casos notificados de dengue no Brasil, 1980-2021.** Série histórica do número de casos notificados de dengue no Brasil entre 1980 a 2021. Fonte: OPAS (2021). Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=2>.

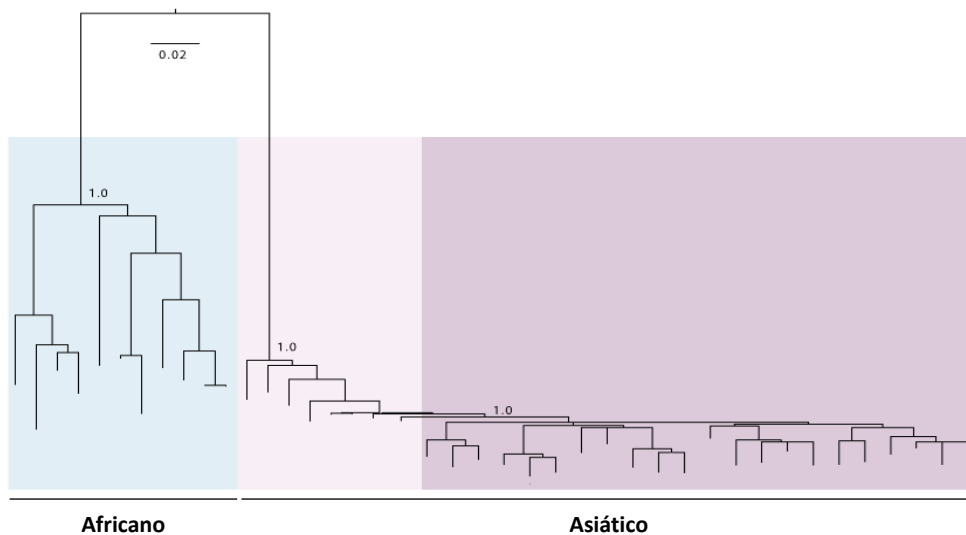
## 1.3 Zika

### 1.3.1 O vírus Zika

ZIKV, também pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, é um vírus esférico, envelopado e que apresenta o genoma formado por RNA de fita simples e senso positiva de aproximadamente 11 kb de tamanho, flanqueado por duas regiões não codificantes (5' e 3' NCRs). Assim como os demais flavivírus, o genoma viral codifica uma única poliproteína que é posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, E e M) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que desempenham importantes funções na formação da estrutura viral assim como na replicação viral e na indução de resposta imune do hospedeiro (SIKKA et al, 2016).

Atualmente, ZIKV é classificado em dois genótipos ou linhagens principais, chamados de africano e asiático com base na sua distribuição geográfica (Figura 6).

O genótipo africano contém duas sublinhagens (África Oriental e África Ocidental), enquanto o genótipo asiático inclui três sublinhagens (Sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico e América) (HIGUERA e RAMÍREZ, 2019). Shen e colaboradores (2016), utilizando sequências dos genes E e NS5, reconstruíram a filogenia de ZIKV e sugeriram a existência de uma segunda linhagem africana, classificando as sequências disponíveis em linhagem Africana 1, Africana 2 e Asiática/Americana. Entretanto, como não estão disponíveis sequências genômicas completas da linhagem Africana 2, que compreende isolados do Senegal e da Costa do Marfim, a observação dessa segunda linhagem apenas nas árvores filogenéticas de genomas parciais tem sido atribuída ao viés de amostragem (XAVIER et al, 2021).



**Figura 6. Reconstrução filogenética de ZIKV.** Reconstrução filogenética inferida a partir da sequência genômica completa de ZIKV de diferentes localidades evidenciando as principais linhagens virais. Fonte: XAVIER et al (2021).

### 1.3.2 Ciclos de transmissão

Assim como DENV, o ZIKV é mantido na natureza entre dois ciclos de transmissão distintos, classificados como silvestre e urbano. Na África e na Ásia, ele é mantido no ambiente silvestre em um ciclo zoonótico entre primatas não humanos e mosquitos da família *Culicidae* e gênero *Aedes*. Anticorpos anti-ZIKV também foram detectados em roedores e grandes mamíferos (orangotangos, zebras e elefantes), entretanto, o papel desses animais como reservatórios virais ainda não está totalmente esclarecido (IOOS et al, 2014; ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016).

Já no ciclo urbano, o principal vetor envolvido na transmissão de ZIKV é o *Ae. aegypti*, também responsável pela transmissão de outros arbovírus (IOOS et al, 2014; ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016). No ciclo de transmissão silvestre, os humanos são considerados hospedeiros acidentais. Entretanto, em áreas onde não existem primatas não humanos, os humanos provavelmente funcionam como hospedeiros primários de amplificação e potencialmente como hospedeiros reservatórios, quando sua viremia é suficiente (HADDOW et al, 2012).

O primeiro vetor descrito para ZIKV foi *Ae. africanus* (HADDOW et al, 1964). Desde então, o vírus tem sido isolado de outras espécies, como *Ae. albopictus*, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. hirsutus*, *Ae. metallicus*, *Ae. taylori*, *Ae. aegypti*, *Ae. hensilli*, *Ae. unilineatus*, *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus* e *Mansonia uniformis* (ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016). ZIKV é transmitido aos artrópodes hematófagos durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. Uma vez no vetor, o vírus se reproduz sem afetá-lo, permanecendo assim por toda a vida. Após a infecção, as fêmeas do mosquito são capazes de transmitir o vírus para humanos durante nova picada (ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016). Embora a transmissão para humanos seja principalmente vetorial, existem evidências de transmissão por transfusão de sangue (MUSSO et al, 2014a), via sexual (FOY et al, 2011; MUSSO et al, 2015a) e perinatal (BESNARD et al, 2014; CALVET et al, 2016). Além disso, RNA e/ou proteínas virais foram detectados na urina (GOURINAT et al, 2015) e saliva (MUSSO et al, 2015b) de indivíduos infectados, destacando a possibilidade de existirem outras formas de transmissão da doença.

### 1.3.3 A doença

ZIKV causa uma infecção que, na maior parte dos casos, é assintomática ou subclínica. Estima-se que sinais e sintomas ocorram em aproximadamente 20% dos casos, onde os pacientes podem desenvolver uma doença semelhante a outras arboviroses (RAWAL et al, 2016). Os sintomas geralmente ocorrem entre 2 e 12 dias após a picada do mosquito vetor e tem duração de aproximadamente 2 a 7 dias. Os sintomas mais frequentes são *rash* maculopapular, febre, artrite ou artralgia, dor de cabeça e conjuntivite não purulenta, embora dor retro-orbital, mialgia, astenia, edemas periféricos e distúrbios gastrointestinais também possam ocorrer (IOOS et

al, 2014; PINTO JÚNIOR et al, 2015; RAWAL et al, 2016; ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016).

Diferentemente das infecções causadas por DENV, complicações hemorrágicas, doença grave que requer hospitalização ou morte em decorrência da infecção por ZIKV são raras (SAMPATHKUMAR e SANCHEZ, 2016). As complicações mais registradas são microcefalia congênita, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e aborto em mulheres infectadas durante a gravidez (RAWAL et al, 2016).

Apesar das causas não estarem totalmente estabelecidas, várias investigações tem sugerido uma ligação entre infecção materna por ZIKV e desenvolvimento de microcefalia em recém-nascidos. Em outubro de 2015, o Ministério da Saúde registrou um aumento de aproximadamente 20 vezes dos casos de microcefalia, principalmente no nordeste do Brasil, uma região com alta prevalência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Além disso, a detecção do RNA viral no líquido amniótico em mulheres cujos fetos nasceram com microcefalia e também em tecidos de recém-nascidos com microcefalia reforçam a ligação entre ZIKV e essa síndrome congênita (MARTINES et al, 2016). Por sua vez, a associação entre a SGB e ZIKV foi registrada pela primeira vez em 2013, durante uma epidemia de Zika na Polinésia Francesa (OEHLER et al, 2014). De fato, durante essa epidemia, 42 casos de SGB foram diagnosticados, sendo que 37 apresentaram infecção prévia por ZIKV. Dados similares foram observados no Brasil durante a epidemia em 2015, onde todos os 121 casos de SGB notificados tiveram histórico de doença semelhante a Zika (ECDC, 2015).

O diagnóstico laboratorial de ZIKV consiste na realização de exames específicos em amostras de soro, urina ou de tecidos de pacientes suspeitos através de (1) métodos diretos, que incluem o isolamento viral, a pesquisa de antígenos virais por imunohistoquímica ou a pesquisa do RNA viral por RT-PCR; ou (2) métodos indiretos, através da pesquisa de anticorpos IgM e IgG em amostras de soro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). Esse último, por sua vez, deve ser interpretado com cautela quando realizado isoladamente, devido à existência de reações cruzadas entre Zika e outros flavivírus, o que dificulta o diagnóstico sorológico em indivíduos habitantes de áreas endêmicas para diversos flavivírus (SAMPATHKUMAR e SANCHEZ, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). Em

casos de recém-nascidos com suspeita de comprometimento neurológico, exames de imagem, tais como ultrassom, tomografia e ressonância, podem auxiliar no diagnóstico da síndrome congênita (RAWAL et al, 2016).

Assim como na dengue, atualmente não existe tratamento antiviral específico para pacientes infectados por ZIKV. Os cuidados recomendados para os pacientes envolvem repouso e tratamento suportivo, incluindo aumento da ingestão de líquidos para prevenir a desidratação e administração de analgésicos e antitérmicos para febre e alívio da dor. Além disso, o paciente deve ser orientado a procurar um serviço de saúde sempre que apresentar piora do quadro ou manifestar formigamento de membros e alterações do nível de consciência para uma avaliação mais cuidadosa do quadro neurológico. Por sua vez, as gestantes com suspeita ou confirmação da doença devem ser acompanhadas por equipe especializada durante todo o pré-natal (SAMPATHKUMAR e SANCHEZ, 2016; ZANLUCA e DOS SANTOS, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Ainda não está disponível uma vacina para prevenção da infecção por ZIKV, por isso as principais medidas preventivas envolvem o controle do mosquito vetor, através da eliminação dos criadouros, e a prevenção pessoal, através do uso de repelentes e outras medidas de proteção individual (IOOS et al, 2014; PINTO JÚNIOR et al, 2015; SAMPATHKUMAR e SANCHEZ, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

#### 1.3.4 Origem e epidemiologia

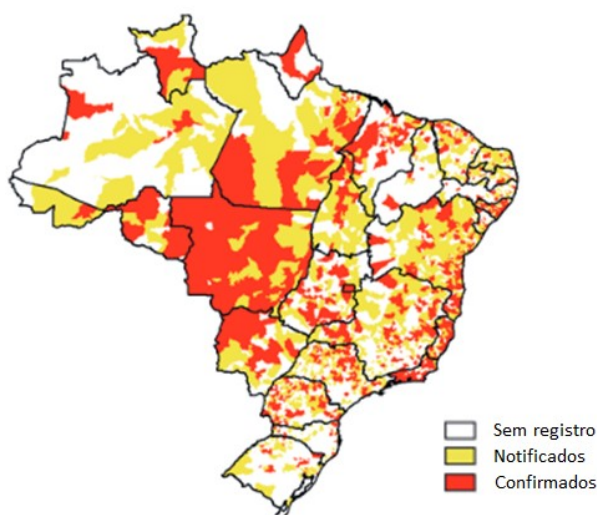
O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir de um macaco *Rhesus* sentinela febril da floresta de Zika, na Uganda (DICK et al, 1952). O vírus não tinha sido associado à infecção em humanos até o ano de 1954, quando ele foi detectado em três pacientes durante um surto na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Neste mesmo período, ZIKV foi isolado de mosquitos *Ae. africanus*, na África (HADDOW et al, 1964) e *Ae. aegypti*, no sudeste da Ásia (MARCHETTE et al, 1969). Desde o seu primeiro registro, casos provocados pela linhagem africana de ZIKV foram limitados à circulação enzoótica entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes* silvestres, com infecção esporádica em humanos (BUATHONG et al, 2015; MUSSO et al, 2019).

Em 2007, uma epidemia causada pelo genótipo asiático ocorreu na Ilha de Yap, Micronésia, onde 49 casos confirmados e 59 casos prováveis de Zika foram registrados. Através de testes sorológicos, estima-se que 73% da população residente tenha sido infectada durante essa epidemia (DUFFY et al, 2009). Em 2013, o ZIKV foi detectado na Polinésia Francesa, onde 396 casos foram confirmados laboratorialmente e aproximadamente 10% da população procurou atendimento médico devido à suspeita da doença (IOOS et al, 2014; BUATHONG et al, 2015). A partir daí, a linhagem asiática de ZIKV expandiu rapidamente para muitas ilhas do Pacífico Sul e novas epidemias foram registradas na Nova Caledônia e Ilhas Cook (MUSSO et al, 2014b).

Nas Américas, os primeiros casos autóctones de Zika foram registrados em 2014 na Ilha de Páscoa, Chile, onde 51 pacientes dos 89 casos suspeitos avaliados foram confirmados no diagnóstico molecular (TOGNARELLI et al, 2016). No início de 2015, os primeiros casos autóctones foram registrados no Brasil. Os pacientes provenientes de Natal, Rio Grande do Norte, relataram uma doença exantemática associada à febre, conjuntivite e artralgia. O RNA viral foi detectado em oito pacientes e as análises filogenéticas sugeriram a infecção pela linhagem asiática de ZIKV (ZANLUCA et al, 2015). A partir daí, casos da doença nas Américas se tornaram comuns e se estenderam para mais de 40 países até dezembro de 2017, com aproximadamente 780 mil casos notificados nesse período (WHO, 2017; OPAS, 2022). Entre 2018 e 2022, ZIKV tem apresentado baixa circulação nas Américas, com aproximadamente 110 mil casos notificados e pouco mais de 17 mil casos confirmados (OPAS, 2022).

No Brasil, em 2015, foram registrados 56.159 casos de Zika, sendo os maiores números reportados nos estados da Bahia, Rio de Janeiro e Mato Grosso (OPAS, 2022). Em 2016, um ano após a confirmação dos primeiros casos em Natal, todos os estados já haviam registrados casos autóctones da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b) (Figura 7). Dados do Ministério da Saúde (2017b) apontam que, nesse ano, o país notificou cerca de 200 mil casos prováveis de infecção por ZIKV distribuídos entre 2.277 municípios, com a maior incidência da doença registrada na região centro-oeste (188,1 casos/100 mil habitantes).





**Figura 7. Casos de infecção por ZIKV no Brasil, 2016.** Distribuição de casos notificados e confirmados de Zika no Brasil até a Semana Epidemiológica 32. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017b).

Em 2017, houve uma redução considerável das notificações de Zika no Brasil. O número de casos foi de 31.754, sendo a maior parte deles registrados nos estados de Goiás, Ceará e Tocantins. Essa tendência de baixa circulação viral, assim como observado nos demais países das Américas, se estendeu para os anos seguintes no Brasil, onde foram registrados cerca de 87 mil casos da doença, com aproximadamente 12 mil confirmações (OPAS, 2022).

#### 1.4 Justificativa

As arboviroses atualmente estão presentes em diversos países e tem sido uma ameaça para grande parte da população mundial, principalmente habitantes de áreas tropicais e subtropicais, onde os mosquitos vetores são amplamente distribuídos (KRAEMER et al, 2015). Por serem doenças para as quais, em sua maioria, não estão disponíveis tratamento antiviral específico e vacina eficaz, estratégias para detectar precocemente as alterações no padrão da doença são necessárias, de forma que ações de prevenção e controle possam ser tomadas oportunamente. Nesse sentido, os estudos de caracterização genética e evolução molecular dos vírus circulantes são importantes aliados.

A abordagem genômica, juntamente com as informações clínicas e epidemiológicas, permite monitorar a introdução de novos vírus e/ou linhagens, a

dispersão viral, a diversidade genética, reconstruir as origens de uma epidemia, identificar cepas/genótipos mais virulentos e/ou com maior potencial epidêmico, além de auxiliar na identificação de países e/ou regiões que atuam como importantes áreas para a dispersão viral (DOS SANTOS et al, 2011; USME-CIRE et al, 2014; FARIA et al, 2016a; FARIA et al, 2017). De fato, tais estratégias foram amplamente utilizadas para compreender a propagação do vírus Ebola na África Ocidental entre 2013-2016 (QUICK et al, 2016; DUDAS et al, 2017), para a rápida identificação do genótipo asiático de ZIKV como responsável pelas epidemias nas Américas e no Brasil (FARIA et al, 2016a; FARIA et al, 2017), para o monitoramento do potencial de transmissão de YFV no sudeste brasileiro (FARIA et al, 2018), assim como para a detecção do genótipo ECSA de CHIKV e a evidência de uma mutação específica no gene E que confere maior adaptação do vírus ao vetor *Ae. albopictus* e, conseqüentemente, maior poder de transmissão (REITER et al, 2006; TSETSARKIN et al 2007; LEPARC-GOFFART et al, 2014). Mais recentemente, a vigilância genômica ganhou ainda mais destaque no cenário da saúde pública, sendo uma das principais estratégias utilizadas para monitorar o surgimento e a dispersão das variantes de SARS-CoV-2, o vírus responsável pela pandemia da COVID-19 (CHERIAN et al, 2021; FARIA et al, 2021; GIOVANETTI et al, 2022; VIANA et al, 2022).

Apesar do Brasil conviver há décadas com epidemias causadas por arbovírus, como dengue, febre amarela, chikungunya e Zika, relativamente pouco é conhecido sobre a diversidade genética desses vírus e a dinâmica de transmissão no país, principalmente das cepas responsáveis pelas últimas epidemias. Para DENV e ZIKV, a maior parte do nosso conhecimento é proveniente de estudos que exploraram a evolução desses vírus nas Américas ou que focaram principalmente em estados ou municípios brasileiros isolados, utilizando genomas parciais (ALLICOCK et al., 2012, BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2016, DOS SANTOS et al., 2011, DUTRA et al., 2017). Diante disso e do cenário cada vez mais preocupante no nosso país, marcado pela reemergência e cocirculação de diferentes arbovírus, este trabalho foi realizado para melhor entender a dinâmica de transmissão de DENV (sorotipos 1 e 2) e ZIKV no Brasil, a partir do sequenciamento e análise de 250 novas sequências genômicas completas desses vírus (DENV1=57, DENV2=170 e

ZIKV=23), aisladas de muestras clínicas de pacientes infectados durante las epidemias recientes de 2015-2019.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a epidemiologia molecular dos DENV e ZIKV durante as epidemias de 2015 a 2019 no Brasil.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Sequenciar o genoma completo de DENV1, DENV2 e ZIKV a partir de amostras clínicas de pacientes com diagnóstico molecular positivo no Brasil;
- Identificar os genótipos dos isolados de DENV1, DENV2 e ZIKV sequenciados;
- Avaliar a diversidade genética de DENV1, DENV2 e ZIKV e a presença de mutações ao longo do tempo;
- Caracterizar a história evolutiva e a disseminação geográfica de DENV1, DENV2 e ZIKV no Brasil durante as epidemias de 2015 a 2019.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Vigilância genômica da transmissão de DENV1 e DENV2 no Brasil**

Artigo *Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil*, publicado na revista *Nature Communication*: ADELINO et al (2021).

## ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22607-0>

OPEN

# Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil

Brazil experienced a large dengue virus (DENV) epidemic in 2019, highlighting a continuous struggle with effective control and public health preparedness. Using Oxford Nanopore sequencing, we led field and classroom initiatives for the monitoring of DENV in Brazil, generating 227 novel genome sequences of DENV1-2 from 85 municipalities (2015–2019). This equated to an over 50% increase in the number of DENV genomes from Brazil available in public databases. Using both phylogenetic and epidemiological models we retrospectively reconstructed the recent transmission history of DENV1-2. Phylogenetic analysis revealed complex patterns of transmission, with both lineage co-circulation and replacement. We identified two lineages within the DENV2 BR-4 clade, for which we estimated the effective reproduction number and pattern of seasonality. Overall, the surveillance outputs and training initiative described here serve as a proof-of-concept for the utility of real-time portable sequencing for research and local capacity building in the genomic surveillance of emerging viruses.

---

\*A full list of authors and their affiliations appears at the end of the paper.

Dengue virus (DENV) has spread extensively over the past decade and now poses a threat to about one-third of the global human population, primarily inhabitants of tropical and subtropical regions where mosquito vectors of the genus *Aedes* are widely distributed<sup>1</sup>. Increases in human mobility and population growth, unplanned urbanization, globalization, climate change, and unsuccessful vector control programs have contributed to DENV's expansion, making it a major public health threat at a global scale<sup>2</sup>. Infection with the virus causes a wide spectrum of clinical manifestations, including asymptomatic or mild self-limiting disease (denoted dengue with and without warning signs), or life-threatening disease characterized by vascular leakage and hemorrhagic symptoms and classified as severe dengue<sup>3</sup>. DENV is a single-stranded, positive-sense RNA virus with a genome of ~11,000 kb belonging to the family *Flaviviridae* (genus *Flavivirus*). Its genome encodes a polyprotein that is post-translationally processed into three structural (capsid, pre-membrane or membrane, and envelope) and seven non-structural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5) proteins<sup>4</sup>.

DENV is classified into four antigenically distinct and genetically related serotypes (DENV1-4), each of which harbor several phylogenetically defined genotypes not exceeding 6% nucleotide divergence and often with differing spatio-temporal distributions<sup>5</sup>. To date, 19 DENV genotypes have been identified, five in DENV1 (II-V), six in DENV2 (2I-VI), and four in DENV3 (3I, 3II, 3III, 3V) and DENV4 (4I-IV)<sup>6</sup>. As serotype heterotypic infections are the highest risk factor for severe clinical outcome, the surveillance of circulating serotype diversity is pivotal to public health. Recent findings suggest that immunity generated by different genotypes of the same serotype may be more complex than previously assumed<sup>7</sup>, such that the contribution of genotype heterotypic infections to clinical outcomes and public health remains largely unknown.

DENV was successfully eradicated in many regions of South America during the mid-twentieth century<sup>8</sup>, with resurgence first reported in Brazil in the early 1980s in the northern state of Roraima<sup>9</sup>. Subsequently, the southern state of Rio de Janeiro played a pivotal role in the sequential resurgence of each serotype: DENV1 was reported to have been introduced there in 1986<sup>10</sup>, DENV2 in 1990 simultaneously with the first epidemic of severe dengue disease<sup>11</sup>, DENV3 in 2000<sup>12</sup>, and finally DENV4 in 2010<sup>13</sup>. Brazil can now be considered hyperendemic for dengue, reporting the highest number of dengue cases worldwide, with approximately 16 million notified infections since the 1980s<sup>14</sup>.

Different serotypes have caused unexpectedly large epidemics in Brazil over the past 20 years, with particularly problematic outbreaks in 2002, 2008, 2010 and 2012–2013<sup>15</sup>. In the years following the Zika virus epidemic (2017–2018) dengue reporting was surprisingly low<sup>15</sup>. However, the re-emergence of DENV2 in 2019 followed the report of a staggering 1,544,987 probable cases and 782 confirmed deaths (until epidemiological week – EW52 2019)<sup>16</sup>. Even with a long history of DENV circulation and recent experience with large outbreaks of other arthropod-borne viruses (arboviruses; e.g., Zika, chikungunya, yellow fever), Brazil continues to struggle with effective mosquito control and public health preparedness<sup>17</sup>. In contrast, over the past five years, the country has become a world leader in real-time genomic surveillance of arboviruses, contributing greatly to the amount of genetic data available in public databases, as well as for understanding the molecular evolution, spread, and persistence of such viruses (e.g., <https://www.zibra2project.org> and <https://www.zibra2project.org>). Despite this significant progress in research capacity, expertise on the methodologies involved in real-time genomic surveillance is absent from higher-education programs and is largely inaccessible to the majority of local researchers and public health workers<sup>18</sup>.

Herein, we describe a research and educational initiative that included genomic surveillance in the field and in the classroom under a two-week training program in 2019, during the post-Zika resurgence of DENV in Brazil. This initiative was attended by a large number of participants from public health and higher-education institutions from across Latin America. During this initiative we generated and analyzed 227 novel complete genome sequences of DENV1 and DENV2. Informed by a mix of public and the newly generated data, climate and epidemiological time series, we used phylogenetic and epidemiological models to infer the recent transmission history of these serotypes in Brazil. From these data we describe a complex dynamic history that supports previously proposed events of viral movement, replacement, and co-circulation. By targeting public health and higher-education institutions, generating and analyzing most of the data in real-time within the training program, we provide a proof-of-concept of the unique opportunities that portable sequencing technologies offer for local capacity building.

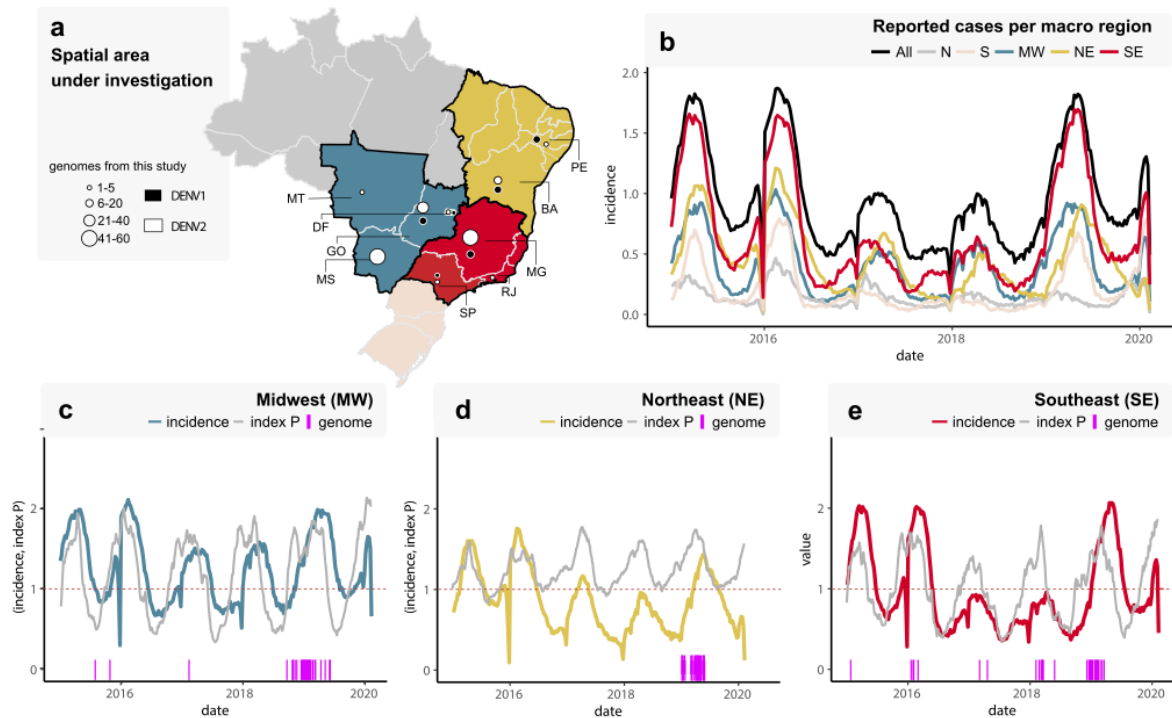
## Results

Dengue serotypes present temporal dynamics with an oscillatory behavior characterized by recurrent peak prevalence every 8–11 years<sup>19</sup>. Due to limitations in local testing capacity, inferring the relative prevalence of DENV1–4 with high spatio-temporal resolution in Brazil is often difficult. Nonetheless, our limited data (Supplementary Table 1) suggests that between 2015 and 2016 DENV1 was the dominant serotype in the Midwest, Northeast, and Southeast regions (Supplementary Fig. 1). Replacement in dominance by DENV2 took place in the Midwest region during 2017 and in the Southeast in subsequent years. Throughout the study period, DENV1 was the dominant serotype in the Northeast region. Although data-limited, these observations were supported by reports from other studies<sup>20–22</sup>, highlighting that the large epidemic of 2019 was dominated by serotypes DENV1 and DENV2. As we were aware of the dominance of DENV1 and DENV2 at the time of planning for the genomic surveillance initiative in 2019, data collection and analysis were focused on those two serotypes.

A total of 248 RT-qPCR positive samples for DENV1 ( $n = 62$ ) and DENV2 ( $n = 186$ ) were screened. Of the samples tested, 227 (DENV1 = 57, DENV2 = 170) contained sufficient DNA ( $\geq 2$  ng/ $\mu$ L) to proceed to library preparation. For those positive samples, PCR cycle threshold (Ct) values were on average 22 (range: 15 to 35) for DENV1 and 23 (range: 16 to 35) for DENV2. Epidemiological details of the samples processed are provided in Supplementary Table 2. We used a portable nanopore sequencing approach<sup>23</sup> to generate the complete genome sequences from the 227 viral samples. The resulting average coverage was 89% for DENV1 and 88% for DENV2. Sequencing statistics are detailed in Supplementary Table 3.

DENV1 sequences covered the time period August 2015 to July 2019 in the Brazilian Federal District ( $n = 2$ ) and five other states (Bahia = 19; Goiás = 10; Minas Gerais = 11; Pernambuco = 11; São Paulo = 4). For DENV2, samples were collected between January 2016 and August 2019 in the Federal District ( $n = 1$ ) and eight other states (Bahia = 20; Goiás = 31; Minas Gerais = 47; Mato Grosso do Sul = 59; Mato Grosso = 2; Pernambuco = 3; Rio de Janeiro = 1; São Paulo = 3) (Fig. 1a). Three older DENV2 samples from the Goiás state, sampled during 2008, were also included. The median age of patients was 28 years (range: 4 to 78 years of age) for DENV1 and 37 years (range: 4 to 90 years of age) for DENV2. With respect to the clinical outcome, 77% of DENV1 (44/57) and 81% of DENV2 (138/170) samples were obtained from patients without alarming clinical signs, 44% of DENV1 (2/57) and 2% of DENV2 (4/170) corresponded to





**Fig. 1** Spatial and temporal distribution of reported dengue cases in Brazil, 2015–2020. **a** Map of Brazil showing the number of DENV1 and DENV2 new sequences by region and state. DF = Federal District, BA = Bahia state, GO = Goiás state, MT = Mato Grosso state, MS = Mato Grosso do Sul state, MG = Minas Gerais state, PE = Pernambuco state, RJ = Rio de Janeiro state, SP = São Paulo state. The color and size of the circles indicates the number of new genomes generated in this study (black = DENV1, white = DENV2). **b** Weekly notified dengue cases normalized per 100 K individuals per region in 2015–2020 (until EW06). Epidemic curves are colored according to geographical macro region: SE = Southeast, NE = Northeast, MW = Midwest, N = North, S = South. **c–e** Time series of weekly reported cases normalized per 100 K individuals and daily mosquito-viral suitability measure (index P) in the three macro regions for which new sequences were generated: MW = Midwest (C), NE = Northeast (D), and SE = Southeast (E). The index P of each region is obtained using average climatic data for the three largest urban centers in each region. Purple bars highlight the dates of sample collection of the genomes generated here. **b–e** Incidence (cases per 100 K population) is presented in log<sub>10</sub> for visual purposes. The initial map of Brazilian regions was obtained from the R package “get\_brmap” (available at: [https://rdr.io/cran/brazilmaps/man/get\\_brmap.html](https://rdr.io/cran/brazilmaps/man/get_brmap.html)). Source data are provided as a Source Data file.

patients with severe dengue. Finally, 19% of DENV1 (11/57) and 17% of DENV2 (28/170) were obtained from fatal cases (Supplementary Table 2).

Weekly reported incidence (cases normalized per 100 K individuals) notified between 2015 and 2020 was aggregated into five Brazilian macro regions: North (N), South (S), Midwest (MW), Northeast (NE), and Southeast (SE) (Fig. 1b). Epidemic curves revealed three major outbreaks in all regions during early 2015, 2016, and mid-2019, with the Southeast region playing such a prominent role that its reported incidence was close to the overall incidence for Brazil (Fig. 1b, Supplementary Fig. 2). For the macro regions with new viral sequences (Midwest, Southeast and Northeast), we estimated transmission potential using a mosquito-viral suitability index. Since it is not possible to obtain representative temperature and humidity time series for the macro regions, we instead used climatic series from the three largest urban centers of each region. While the latter neglects climate variation within a macro region (Supplementary Fig. 3), the seasonal timing of reported cases was still well captured by the suitability index (Fig. 1c–e). The years 2015, 2016, and 2019 did not show particular increases in suitability, suggesting that the corresponding larger epidemics were not driven by particular climatic trends<sup>20</sup>, but rather by factors not accounted for by the index (e.g., sociodemographic, lack of herd immunity, change in circulating serotype or genotype, size of the mosquito

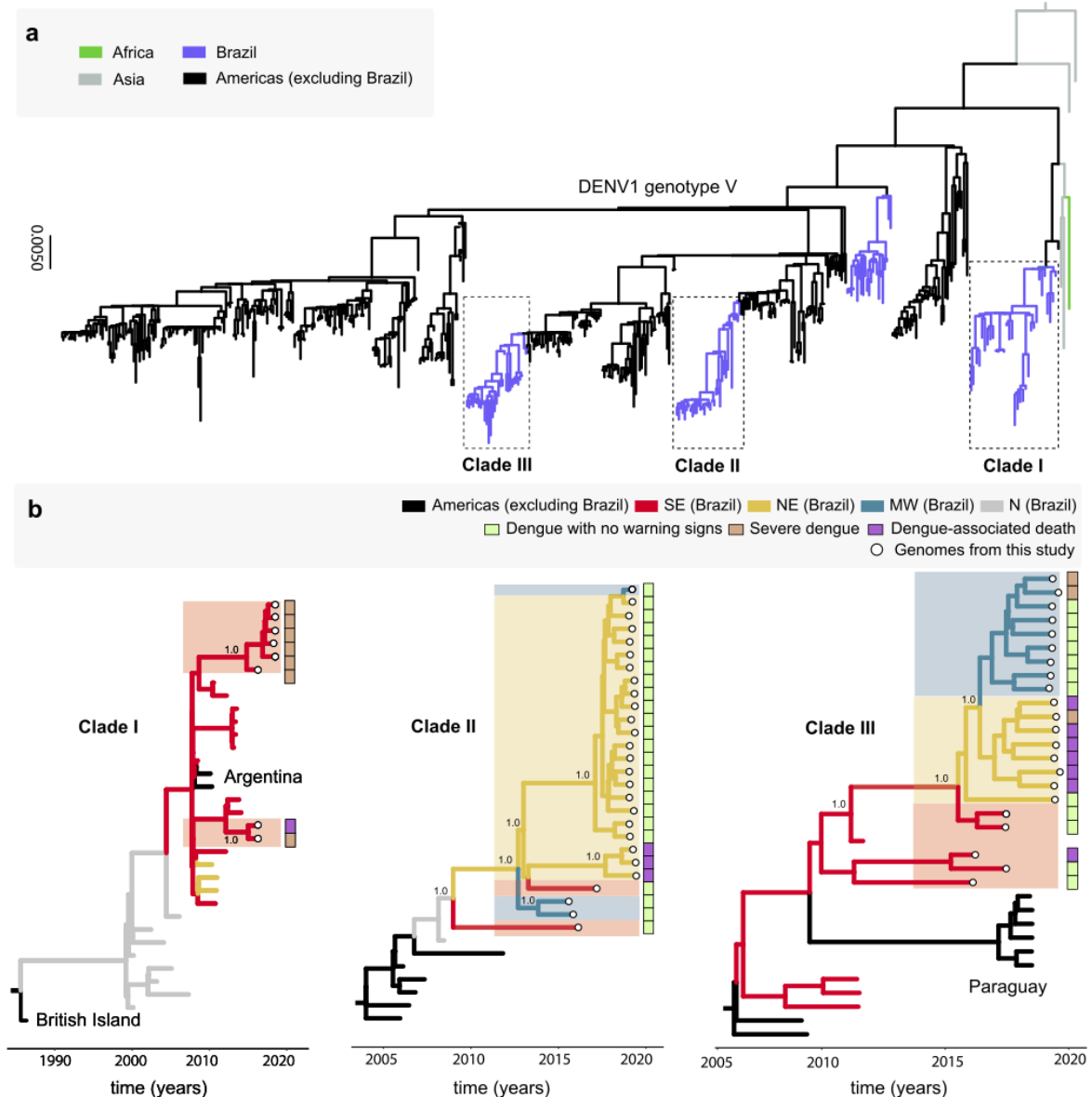
population). There was also a clear decrease in reported cases across the regions during the aftermath of the Zika virus epidemic (2017–2018), a phenomenon also reported elsewhere<sup>20,24,25</sup>. In contrast, reporting of other arboviruses (e.g., chikungunya, Supplementary Fig. 4) saw increases in incidence during the same period. As such, we found no support for either climate driven reductions in transmission potential or arboviral reporting saturation that could explain the drop in DENV reporting between 2017 and 2018, suggesting that local herd immunity (serotype-specific or induced by Zika infection) may have played a role. Finally, apart from a few exceptions, the dates of the new sequences matched time periods of both high suitability and case reporting for all regions and were thus representative of epidemic periods (Fig. 1c–e).

Between 2015 and 2019, a total of 3,180 deaths attributed to DENV were reported in Brazil. We found a clear seasonal signal in weekly reported deaths that matched the seasonality of weekly reported cases and suitability for transmission (Supplementary Fig. 5). The year 2019 has been widely reported as experiencing a substantial increase in both the number of cases and deaths. Accordingly, we found the Midwest and Northeast regions had an increase in the absolute number of deaths in 2019 compared to previous years (Supplementary Fig. 5b and d). However, when the weekly (crude) case fatality rate (CFR = deaths/cases) was calculated there was no increase in the CFR during 2019 for any of



the regions (Supplementary Fig. 5c, e, g). When aggregating the CFR between 2015 and 2019, we found the Midwest to have a higher CFR at 0.00084 ( $1.78 \times 10^{-05}$ – $2.01 \times 10^{-03}$  95% range) compared to 0.0006 for the Northeast (0–0.0030) and 0.00037 for the Southeast regions (0–0.0010) (only the Midwest versus Southeast and Northeast comparisons were statistically different using a Wilcoxon test; p-values 5.76e-09 and 3.775e-05, respectively).

**DENV1 phylodynamics in Brazil, 2015 to 2019.** To explore the phylodynamics of DENV1, we combined our 57 newly generated sequences to those DENV1 genotype V (DENV1-V) genomes available on GenBank ( $n = 444$ ). Phylogenetic analysis revealed that the novel isolates were organized into three distinct clades, named hereafter as clades I, II, III (Fig. 2a). Clade I appeared to have been replaced by clades II–III during 2019. The DENV resurgence in 2019 was characterized by the co-circulation of two



**Fig. 2 Phylogenetic analysis of DENV1-V in Brazil.** **a** Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis of 57 complete genome sequences from DENV1 generated in this study plus 444 publicly available sequences from GenBank. The scale bar is in units of nucleotide substitutions per site (s/s) and the tree is mid-pointed rooted. Colors represent different sampling locations. **b** Time-scaled phylogeographic tree of Clade I (including eight new sequences plus 25 GenBank sequences), Clade II (including 27 new sequences plus seven GenBank sequences), and Clade III (including 22 new sequences plus 12 GenBank sequences). Colors represent different sampling locations (SE Brazil = Brazilian Southeast, NE Brazil = Brazilian Northeast, MW = Brazilian Midwest, N Brazil = Brazilian North). Tip circles represent the genome sequences generated in this study; colored sidebars represent the dengue clinical classification for each sequenced sample.

viral lineages with no particular signatures suggesting clade-related advantages. In light of this, non-virological factors such as the level of susceptibility in the population remained a plausible driver of the expansion of both clades.

To investigate the evolution of clades I–III in more detail, we used smaller data sets derived from each clade individually, which only include sequences closely related to the newly Brazilian isolates ( $n = 33$  for Clade I,  $n = 34$  for Clade II and  $n = 34$  for Clade III). An analysis of substitution rate constancy revealed a strong correlation between the sampling time and the root-to-tip divergence in all three data sets (Supplementary Fig. 6), allowing the use of molecular clock models to infer evolutionary parameters. Phylogeographic analyses of clade I (Fig. 2b) clustered the new sequences into a single well-supported monophyletic sub-clade (posterior probability support, PPS = 1.0), including isolates sampled between 2000 and 2018. New sequences in this clade were mainly from severe dengue cases registered in the SE region. The time to the most recent ancestor (tMRCA) of all Brazilian sequences was estimated to be between June 1998 to February 2000, and this common ancestor likely originated in the North region (PPS = 1.0), after a dispersion of a virus from the British Virgin Islands (PPS = 1.0). Viruses from this clade spread from the North region towards the Southeast and then the Northeast, as indicated by isolates from the Pernambuco (PE) state (represented by JX669461, JX669465, and JX669464). The tMRCA of all isolates from the Southeast and Northeast regions in this clade was estimated to be between May 2006 to February 2008.

Similarly, an analysis of clade II (Fig. 2b) revealed a single well-supported monophyletic group (PPS = 1.0), including isolates from the Southeast, Midwest, and Northeast regions sampled between 2015 and 2019. The majority of the new sequences were from mild dengue cases, although three isolates were recovered from fatal cases in the Northeast. The tMRCA of this group was dated to be between August 2007 and May 2010, with a likely origin in the North region. However, as the PPS value was low (0.39) the place of origin remains uncertain. After its introduction into the North region, viruses from this lineage appear to have moved towards the Southeast, Midwest, and Northeast. Notably, the clade appears to have persisted locally after its introduction in the Northeast region between July 2011 to June 2014, and from there a second introduction into the Midwest region may have occurred, as suggested by a single isolate (OPAS134) sampled in 2019.

Finally, clade III (Fig. 2b) also formed a single supported monophyletic group (PPS = 0.82) that contained sequences from the Southeast, Northeast, and Midwest regions sampled between 2011 and 2019. Among our new isolates, six were from fatal cases reported in the Northeast. We estimated the age of this sub-clade to be between October 2009 to August 2011, with a most likely origin in the Southeast region (PPS = 0.99). Since its introduction, the clade has circulated in the Southeast, from where it has later dispersed to Paraguay. The Southeast region has also seemingly seeded outbreaks into the Northeast (PPS = 0.88) between February 2015 and September 2017, and subsequently towards the Midwest region between June 2016 to April 2018.

**DENV2 phylodynamics in Brazil, 2016 to 2019.** To explore the phylodynamics of DENV2 between 2016 and 2019, we performed a phylogenetic analysis of the 170 newly generated sequences plus 450 complete genome sequences of DENV2-III available on GenBank (Fig. 3). This analysis revealed four different clades (termed hereafter BR-1 to BR-4 clades)<sup>22</sup>. Notably, BR-1 contained Brazilian sequences sampled from 1990–2000, BR-2 from 2000–2006, and BR-3 from 2006–2019. The latter included six of our new isolates (34%, 6/170) collected during previous outbreaks in 2008 (Goiás = 3) and 2016 (São Paulo = 3). Finally, BR-4

contained the other 164 new sequences (97%, 164/170), sampled between 2016 and 2019. This phylogenetic pattern suggested that between 2016 and 2019, DENV2 circulated in these Brazilian regions with a succession of different viral clades. In particular, with BR-3 preceding BR-4, and with older clades (BR-1, BR-2) either not being sampled in the most recent time-points or having experienced local extinction. These results were consistent with a recent study highlighting the role of the Caribbean region in the spread of the BR-4 clade into Brazil<sup>20,22</sup> (Fig. 3a).

Given the substantial number of novel sequences, we examined the BR-4 clade in more detail (Fig. 3b) (and a linear regression of root-to-tip genetic distance against sampling date revealed sufficient temporal signal,  $r^2 = 0.60$ ; Supplementary Fig. 7). The BR-4 clade (PPS = 1.0) included 181 isolates from the Southeast, Northeast, and Midwest regions, 92% (167/181) of which were sampled during the 2019 outbreak and 88% (14/181) sampled between 2016 and 2018. Of these, 133 were from dengue without warning signs, while three isolates were recovered from severe dengue, and 28 were from fatal dengue cases. We identified two distinct BR-4 lineages circulating between 2017 and 2019, which we termed BR-4L1 and BR-4L2 (Fig. 3b). Both lineages contained sequences from the Northeast, Southeast, and Midwest regions. The tMRCA of BR-4L1 was estimated to be between September 2014 and June 2016, while the tMRCA of BR-4L2 was dated between March 2015 to November 2016. BR-4L2 contained a monophyletic cluster of isolates from the Midwest sampled between 2018 and 2019. We also observed that the other isolates from the Northeast and Midwest regions were intermixed throughout both lineages, indicating multiple introductions of DENV2 over time. Similar to recent studies<sup>22</sup>, we found the tMRCA of BR-4 to be between November 2013 and May 2015, likely in the Southeast (PPS = 0.99), from where the virus dispersed towards the Northeast and Midwest regions. Minas Gerais state, located in the Southeast, seems to have played an important role as source location, since sequences from this region (from 2016) fell close to the root of the clade (Fig. 3b).

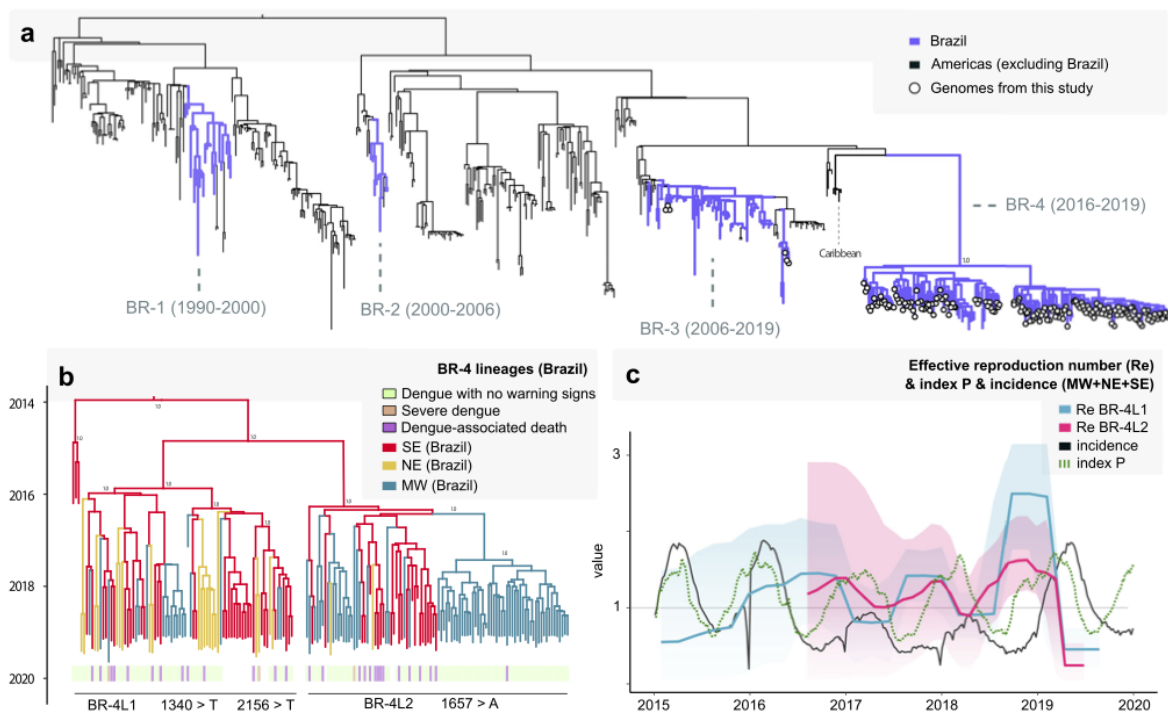
We identified 34 single nucleotide variants between the BR-4L1 and BR-4L2 lineages, only three of which resulted in amino acid substitutions. Isolates of the BR-4L1 acquired one unique amino acid substitution A447V (ENV protein), while only a few isolates of this lineage had a second amino acid substitution K719I (NS5 protein). All isolates of BR-4L2 acquired one unique amino acid substitution V553I (NS5 protein) (Supplementary Table 4).

We used a birth-death skyline (BDSKY) model to estimate the effective reproduction number ( $R_e$ ) of BR-4L1 and BR-4L2 (Fig. 3c). This provided evidence for three significant seasonal oscillations in  $R_e$  (although with wide credible intervals), consistent but generally preceding the time windows of reported outbreaks between 2016 and 2019 (Fig. 1c–e). Mosquito-viral suitability presented the same general patterns, but the timing of its oscillations was in between that of  $R_e$  and incidence (Fig. 3c). In general, our estimates of  $R_e$  for both lineages peaked at the end of each year, decreasing and remaining below 1 temporarily at the start of each following year (although again, with wide credible intervals). Notably, the time period with the largest  $R_e$  for both lineages at the end of 2018 and preceding the large epidemic of 2019 (in excess of 2.5 for BR-4L1 and 1.5 for BR-4L2) did not coincide with similar increases in suitability, once again suggesting that climate-related factors were not the drivers of epidemic success.

## Discussion

More than 16 million cases of dengue disease have been notified since the early 1980s in Brazil<sup>9,14</sup>. Previous studies have explored the evolution of DENV1–4 in the Americas, mainly focusing on a





**Fig. 3** Phylogenetic analysis of DENV2-III in Brazil. **a** A maximum likelihood tree was inferred using 170 complete genome sequences from DENV2 generated in this study and 450 sequences publicly available, retrieved from GenBank. The scale bar is in units of nucleotide substitutions per site (s/s) and mid-point rooted. Tip circles represent the genome sequences generated in this study. **b** Time-scaled phylogeographic tree of DENV2 BR-4, including 164 new DENV2 sequences generated here and 17 publicly available data from the 2019 outbreak in Brazil<sup>22</sup>. Sequences are colored according to sampling location. Sidebars represent the dengue clinical classification for each sequenced sample. **c** Temporal fluctuation of the effective reproduction number ( $R_e$ ) of the for DENV2 BR-4L1 (blue) and BR-4L2 (magenta) estimated using the Bayesian birth-death approach. Black line is the total weekly incidence of dengue between 2015 and 2020 (until EW06), and the dotted green line is the index P (incidence is summed and index P is averaged over the three macro regions for which new sequences were generated: MW = Midwest, NE = Northeast, and SE = Southeast). Incidence (cases per 100 K population) is presented in log<sub>10</sub> for visual purposes.

restricted range of countries using partial genome sequences<sup>26–29</sup>. To obtain a better understanding of DENV evolution in Brazil, in particular during its resurgence in 2019 when DENV1-2 dominated reported cases, we generated 227 new complete genome sequences of both serotypes using portable sequencing. Importantly, more than three quarters of the new sequences were processed and analyzed during a Nanopore-based genome sequencing training and surveillance program that took place in Belo Horizonte, Minas Gerais state, in 2019. The new 227 sequences generated corresponded to 55% (57/104) of DENV1-V, and 60% (170/285) of DENV2-III Brazilian complete genomes that are currently available in public databases (Supplementary Fig. 8). This highlights the large contribution of the training initiative, but also the current shortage of complete genome data for both serotypes. There is clearly a need for continued funding for genomic surveillance which, as shown here, can contribute to a better understanding of the introduction, spread, and persistence of dengue viruses in Brazil during epidemics with significant public health impact.

Time series of reported cases between 2015 and 2019 showed the typical yearly seasonal patterns of dengue transmission. Reporting was low in 2017 and 2018, coinciding with the post-epidemic period of the Zika virus in Brazil. Such trends have also been reported in other countries<sup>20,24</sup> and are speculated to be driven by transient cross-protection from exposure to Zika, and/or temporary saturation or changes in surveillance<sup>20,30</sup>. When

comparing to reported cases of chikungunya virus and estimated mosquito-viral suitability in the same period, we found no evidence of changes in capacity for arboviral surveillance or climate driven low transmission potential in favor of other mechanisms (e.g., Zika cross-immunity). In contrast to this period of low circulation, there were three particularly large DENV epidemics: in 2015 and 2016 when DENV1 was dominant across all regions, and in 2019 when DENV1 was dominant in the Northeast but DENV2 was dominant in the Midwest and Southeast regions. Due to the increased likelihood of secondary infections, serotype replacement is often associated with measurable changes in the clinical spectrum of reported cases, with increases in both disease severity and number of deaths<sup>11,29,31</sup>. While we describe an increase in absolute case and death numbers in 2019, the emergence of DENV2 in the Southeast and Midwest regions was not associated with a significant increase in the case fatality rate compared to previous years.

Our newly generated DENV1 sequences were classified as genotype V and formed three distinct clades (I–III). This supports previous reports suggesting that such clades were responsible for the latest DENV1 outbreaks in Brazil<sup>27,28,31,32</sup>. Within clade I, only eight of the new sequences were sampled between 2016–2018, with many isolates preceding 2015. The shortage of genomic data in the intermediate years severely hampered our capacity to draw further conclusions, such as the possibility of a temporary lineage replacement event. In contrast, most of the

new sequences within clades II–III were sampled in 2019, supporting the co-circulation of two DENV1 lineages in recent epidemics – a phenomenon often described in DENV epidemics<sup>27,28,31,32</sup>. Viruses from the three clades have been identified in both the Southeast and Northeast regions, although the most recent ones only appeared in the Southeast, while viruses from clades II–III were present in the Northeast and Midwest regions. While this suggested some structure in spatio-temporal circulation, we could not ascertain if it was simply to biased sampling. Time estimates of the tMRCA of the new Brazilian isolates (2015–2019) were between May 2006 and February 2008 for clade I, between August 2007 and May 2010 for clade II, and between October 2009 to August 2011 for clade III. Such large ranges are likely reflecting the lack of genomic data during this period, reinforcing the need for a more effective surveillance in Brazil.

All new DENV2 complete genome sequences belong to genotype III, which has been found in previous epidemics in Brazil<sup>22,33</sup>. Our results are in line with reports of three different lineages causing outbreaks in Brazil since 1990<sup>32,33</sup>, and support a recent introduction of DENV2-III<sup>20,22</sup>. Viruses from this genotype grouped in four different clades (BR-1 to BR-4) with apparent replacement over time. Specifically, the oldest lineage BR-1, including isolates from 1990–2000, was replaced by BR-2 comprising sequences from 2000–2006, itself subsequently replaced by BR-3 containing isolates from 2006–2019. Finally, BR-3 was replaced by BR-4, containing sequences sampled between 2016–2019, some closely related to Caribbean isolates sampled in 2005. In a similar manner to DENV1, DENV2 BR-3 and BR-4 isolates from 2019 demonstrated the co-circulation of at least two different lineages in recent years<sup>22</sup>. The phylogenetic relationship to Caribbean sequences suggested a possible origin in this region, although there is a large temporal gap between the sampling of the Caribbean sequences from 2005 and the early Brazilian sequences from 2016, again highlighting the need for more genomic surveillance in Brazil. The tMRCA of BR-4L1 was estimated between September 2014 and June 2016 and between March 2015 and November 2016 for BR-4L2, coinciding with the emergence and spread of the Zika<sup>34</sup> and Chikungunya<sup>35</sup> viruses, and a high incidence of dengue in Brazil. Six years after introduction, the lineages continue to circulate in the Southeast region and were present in the most recent large epidemic of 2019. From the Southeast, dispersion was towards the Northeast and Midwest regions, with multiple independent introductions identified.

Analysis of the 181 isolates from three macro regions (Northeast, Midwest and Southeast) allowed us to estimate the emergence of DENV2 BR-4 in the Southeast between November 2013 and May 2015, supporting previous reports<sup>20,22</sup>. After its introduction, BR-4 circulated as two distinct lineages (BR-4L1 and BR-4L2). We observed three single nucleotide variants among the lineages that resulted in amino acid substitutions: A447V and K719I were identified in the BR-4L1, while V553I was identified in BR-4L2. A447V (ENV protein) and V553I (NS5 protein) appear to be conservative changes due to the interchangeable character for the respective amino acids<sup>36</sup>. In contrast, K719I in the NS5 protein has changed from a negatively charged to an aliphatic amino acid<sup>36</sup>. Further studies are required to elucidate the impact of these variants on structure and function of the associated proteins, and any potential role in both viral pathogenesis and fitness.

Our retrospective reconstruction of the recent transmission history of DENV1 and DENV2 revealed that the Southeast and North regions of Brazil were key to dispersal in Brazil. This is in line with studies that have highlighted both regions as important hubs for introduction and dispersion in the country, not only of DENV<sup>9–12,27,31,33</sup>, but also for yellow fever virus<sup>37</sup>. By combining

genetic and epidemiological models we showed that the establishment and the co-circulation of the BR-4L1 and BR-4L2 lineages of DENV2 in several Brazilian regions occurred during a time window of sustained transmission potential measured by estimates of  $R_e$  and mosquito-viral suitability. These results are consistent with sufficient ecological suitability for the virus's main vectors (*Aedes* spp.) and insufficient population-level herd-immunity, supporting the expectation of continuing endemic circulation of these dengue viruses in Brazil.

The new genomic data presented here were generated using portable sequencing tools in a field surveillance initiative (ZiBRA-2 project) and a genomic surveillance training program. We present a range of research outputs describing the recent history and genomic epidemiology of DENV1 and DENV2 in Brazil during the resurgence of this virus in 2019: this both corroborates previous studies and greatly increases the number of public viral genome sequences available for analysis. We also identified gaps in existing genomic data, that curtailed definite conclusions on key points of the recent history of DENV in Brazil. Importantly, epidemiological and genomic data was analyzed in real-time during the training program and subsequently during online sessions, and the participants attending the training program made a significant contribution to the research outputs generated. We call for continued funding of similar field and classroom genomic surveillance initiatives. These have the potential to build local capacity in the field of genomic surveillance and in doing so advance our understanding on the population biology of circulating arboviruses and other emerging pathogens.

## Methods

**Ethics statement.** This project was reviewed and approved by the Pan American Health Organization Ethics Review Committee (PAHOERC) (Ref. No. PAHO-2016-08-0029) and the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (CAAE: 90249218.6.1001.5248). The availability of these samples for research purposes during outbreaks of national concern is allowed to the terms of the 510/2016 Resolution of the National Ethical Committee for Research – Brazilian Ministry of Health (CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Ministério da Saúde), that authorize, without the necessity of an informed consent, the use of clinical samples collected in the Brazilian Central Public Health Laboratories to accelerate knowledge building and contribute to surveillance and outbreak response. The samples processed in this study were obtained anonymously from material exceeding the routine diagnosis of arboviruses in Brazilian public health laboratories that belong to the public network within BrMoH.

**Field genomic surveillance with a mobile laboratory.** In May 2019 we implemented an arbovirus surveillance project that took place across the Midwest of Brazil using a mobile genomics laboratory (Supplementary Fig. 9). This Brazilian-driven initiative, known as the ZiBRA-2 project, was supported by the BrMoH (<https://www.zibra2project.org>).

**Classroom genomic surveillance in a training program.** In August 2019 a genomic surveillance training program organized by PAHO and BrMoH took place in Belo Horizonte (Minas Gerais state) under the title “Nanopore-based genome sequencing technology for temporal investigation and epidemiology of dengue outbreak: training, research, surveillance, and scientific dissemination”. The syllabus included practical and theoretical courses on a variety of subjects related to arbovirus research and surveillance, including mobile sequencing technologies, bioinformatics, phylogenetics, epidemiological modeling, and field epidemiology and entomology. The course was taught by experienced researchers from national and international institutions, such as the University of Oxford (United Kingdom), University of KwaZulu-Natal (South Africa), University Nova de Lisboa (Portugal), Sechenov First Moscow State Medical University (Russia), Oswaldo Cruz Foundation (Brazil), Federal University of Minas Gerais (Brazil), Federal University of Rio de Janeiro (Brazil), Federal University of Pernambuco (Brazil), University of São Paulo (Brazil), University of Brasília (Brazil), State University of Feira de Santana (Brazil), and University of Salvador (Brazil). The course had 62 students from 34 national and international institutions (age range of participants between 25–50). In addition to post-graduate students, course participants included laboratory technicians and health practitioners in universities and laboratories from several institutions responsible for laboratory-based surveillance of emerging and reemerging diseases, such as the Central Public Health Laboratories of the Brazilian states from the BrMoH's network and public health laboratories from Paraguay, Argentina, Panama, Chile, Mexico, Uruguay, Costa Rica, and Ecuador.



The event targeted post-graduate students, laboratory technicians, and health practitioners in universities and laboratories across the Americas and was based on the principles of Responsible Research and Innovation (RRI)<sup>38</sup>. Details on the program can be found in Supplementary Text File 1.

**Sample collection and molecular diagnostic assays.** Clinical samples from patients with suspected DENV infection were obtained for routine diagnostic purposes at local health services in different Brazilian municipalities. These samples were sent for molecular diagnosis to the respective local Central Laboratory of Public Health (LACEN) from the Brazilian Federal District (DF) and from the states of Bahia (BA), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), and Rio de Janeiro (RJ). These states had some of the highest registered burdens during the 2019 DENV resurgence according to the protocol established by the BrMoH. Samples processed from the state of São Paulo (SP) were collected by the Blood Center of Ribeirão Preto from volunteer blood donors eligible for blood donation and who reported adverse effects up to 14 days after donation.

Viral RNA was extracted from all clinical samples using the QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and tested by RT-qPCR for detection of DENV1-4. Selected samples with previous positive diagnostic results for DENV1-2 were processed in two steps: (1) 73 samples from the states of Goiás, Mato Grosso do Sul, and Mato Grosso were processed during the ZiBRA-2 project, (2) 175 samples from the Brazilian Federal District and Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, and São Paulo states were processed during the training program (both initiatives described in the section above). Samples from the 2019 outbreak, as well as available samples from previous epidemic waves in 2008 and between 2015–2018, were included for diagnostic screening.

**cDNA synthesis and whole genome sequencing using the MinION.** Samples were selected for sequencing based on the Ct value ( $\leq 35$ ) and availability of epidemiological metadata, such as date of symptom onset, date of sample collection, sex, age, municipality of residence, symptoms, and disease classification. For complementary DNA synthesis, the SuperScript IV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) was used following the manufacturer's instructions. The cDNA generated was subjected to sequencing multiplex PCR (35-cycles) using Q5 High Fidelity Hot-Start DNA Polymerase (NEB) and a set of specific primers designed by the CADDE project (<https://www.caddecetre.org/>) for sequencing the complete genomes of DENV1 and DENV2<sup>39</sup> (Supplementary Table 5).

Amplicons were purified using 1x AMPure XP Beads (Beckman Coulter) and quantified on a Qubit 3.0 fluorimeter (ThermoFisher Scientific) using Qubit<sup>™</sup> dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Of the 248 samples, 227 contained sufficient DNA ( $\geq 2$  ng/ $\mu$ L) to proceed to library preparation. DNA library preparation was performed using the Ligation Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies) and the Native Barcoding Kit (NBD103, Oxford Nanopore Technologies)<sup>23</sup>. Sequencing libraries were generated from the barcoded products using the Genomic DNA Sequencing Kit SQK-MAP007/SQK-LSK208 (Oxford Nanopore Technologies) and loaded into a R9.4 flow cell (Oxford Nanopore Technologies). In each sequencing run we used negative controls to prevent and check for possible contamination with less than 2% mean coverage.

**Generation of consensus sequences.** Raw files were basecalled using Guppy v3.4.5 and barcode demultiplexing was performed using qcat. Consensus sequences were generated by de novo assembling using Genome Detective (<https://www.genomedetective.com/>)<sup>40</sup>. Briefly, Genome Detective uses DIAMOND to identify and classify candidate viral reads in broad taxonomic units, using the viral subset of the Swissprot UniRef90 protein database. Candidate reads are next assigned to candidate reference sequences using NCBI blastn and aligned using AGA (Annotated Genome Aligner) and MAFFT. Final contigs and consensus sequence are then available as FASTA file. More detail about Genome Detective can be found in<sup>40</sup>. The new sequences reported in this study (DENV1  $n = 57$  and DENV2  $n = 170$ ), were initially submitted to a genotyping analysis using the arbovirus phylogenetic subtyping tool, available at <http://genomedetective.com/app/typingtool/dengue>; this confirmed that the newly genomes belonged to the genotypes DENV1-V and DENV2-III, respectively.

**Phylogenetic analysis.** DENV genotyping was performed using the Dengue Virus Typing Tool (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/dengue/>)<sup>6</sup>. To investigate the evolution and population dynamics of DENV1-2 in different Brazilian regions, the DENV1 ( $n = 57$ ) and DENV2 ( $n = 170$ ) complete genome sequences generated in this study were combined with globally sampled and publicly available complete genome sequences from DENV1 genotype V (DENV1-V = 444) and DENV2 genotype III (DENV2-III = 450) as these represent the dominant genotypes in the Americas. The latter were retrieved from NCBI up to November 2019. We also included 17 recently published of the outbreaks in the Brazilian Southeast region<sup>25</sup>. Sequences without sampling date and location were excluded, as were sequences covering less than 50% of the viral genome.

Sequence alignment was performed using MAFFT<sup>41</sup> and manually curated to remove artifacts using Aliview<sup>42</sup>. Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees were estimated using IQ-TREE<sup>43</sup> under the GTR nucleotide substitution model,

which was inferred as the best-fit model by the ModelFinder application implemented in IQ-TREE<sup>44</sup>. The robustness of the tree topology was determined using 1,000 bootstrap replicates, and the presence of temporal signal was evaluated in TempEst<sup>45</sup> through a regression of root-to-tip genetic distances against sampling time. Time-scaled phylogenetic trees were inferred using the BEAST package<sup>46</sup>. We employed a stringent model selection analysis using both path-sampling (PS) and stepping stone (SS) procedures to estimate the most appropriate molecular clock model for the Bayesian phylogenetic analysis<sup>47</sup>. The uncorrelated relaxed molecular clock model was chosen as indicated by estimating marginal likelihoods, also employing the codon based SRD06 model of nucleotide substitution and the non-parametric Bayesian Skyline coalescent model. A discrete phylogeographic model<sup>48</sup> was used to reconstruct the virus spatial diffusion across the sampling locations. Discrete locations were initially defined as the country of sampling. However, a different resolution was applied according to sampling availability. Phylogeographic analyses were then performed by applying an asymmetric model of location transitioning coupled with the Bayesian Stochastic Search Variable Selection (BSSVS) procedure. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) were run in duplicate for 100 million iterations to ensure stationarity and an adequate effective sample size (ESS) of  $>200$ . Maximum clade trees were summarized using TreeAnnotator after discarding 10% as burn-in and visualized using FigTree v1.4.4.

**Epidemiological data and integration with genomic data.** Data of weekly notified and laboratory confirmed cases of infection by DENV in Brazil during 2015 to 2019, as well as monthly fatal cases with confirmed dengue infection, were supplied by the BrMoH. A mosquito-viral suitability measure (index P) was estimated using the MVSE R-package<sup>49</sup>. The index P measures the reproductive (transmission) potential of a single adult female mosquito in a completely susceptible host population and is informed by local temperature and humidity time trends. We used daily climatic data from the three largest cities of each macro region for which new sequences were generated (Midwest: Goiânia, Brasília, Campo Grande; Southeast: São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte; Northeast: Salvador, Recife, Fortaleza), with data obtained from openweathermap.org.

**Estimating  $R_t$  from genetic sequences.** We used birth-death models implemented in BEASTv2.4<sup>50</sup> to estimate the  $R_t$ . In this model, each infection may transmit at a rate  $\lambda$  and will become non-infectious at a rate  $\delta$ . Upon becoming infected, each individual is sampled with a probability  $s$ . The model enables the piecewise estimation of  $R_t$ ,  $\delta$ , and  $s$  through time. We assumed sampling proportion  $s$  to be constant over time. Relaxing this assumption to allow the parameter  $s$  to be zero for the periods when no sequence data was available resulted in similar trends for  $R_t$ , with wider Bayesian credible intervals. The rate  $\delta$  was modeled using a lognormal prior with a mean of 14 days and a standard deviation of 0.5, which roughly corresponds to the sum of the intrinsic and extrinsic incubation period of dengue virus. The BDSKY analysis was run for an independent MCMC chains of  $>100$  steps, with parameters and trees being sampled once every 10,000 steps. After removal of 10% burn in, sampled parameters were combined using LogCombiner.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

Newly generated DENV1 and DENV2 sequences have been deposited in GenBank under accession numbers MT929528–MT929754. More detail about the sequences generated can be found at Supplementary Table 3. Source data are provided with this paper. Alignments, tree files and epidemiological data can be found at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4604002>. Source data are provided with this paper.

Received: 16 September 2020; Accepted: 17 March 2021;

Published online: 16 April 2021

## References

- Kraemer, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife* **4**, e08347 (2015).
- San Martin, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 128–135 (2010).
- WHO. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. (World Health Organization, Geneva, 2009).
- Rice, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* **229**, 726–733 (1985).
- Rico-Hesse, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* **174**, 479–493 (1990).

6. Fonseca, V. et al. A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007231 (2019).
7. Martinez, D. R. et al. Antigenic variation of the dengue virus 2 genotypes impacts the neutralization activity of human antibodies in vaccinees. *Cell Rep.* **33**, 108226 (2020).
8. Pinheiro, F., Nelson, M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. Pan American Health Organization, Dengue Bulletin - vol 21, 1997. <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/148532/dbv21p16.pdf;jsessionid=D864AEA12BE652014C9DFB07CCFFCA0E?sequence=1>> (accessed 02 Aug 2020).
9. Osanai, C. H. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima - Nota prévia. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **25**, 53-54 (1983).
10. Schatzmayr, H. G., Nogueira, R. M. & Travassos da Rosa, A. P. An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **81**, 245-246 (1986).
11. Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., Lampe, E. & Schatzmayr, H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **85**, 253 (1990).
12. Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., de Filippis, A. M., Pereira, M. A. & Schatzmayr, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 925-926 (2001).
13. Nunes, M. R. T. et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1858-1864 (2012).
14. PAHO/WHO. Reported cases of dengue fever in the Americas. <<https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>> (accessed May 15, 2020).
15. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. 2019. <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>> (accessed May 20, 2020).
16. Brasil. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. 2020. <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>> (accessed May 20, 2020).
17. Salles, T. S. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasit. Vectors* **11**, 264 (2018).
18. Faria, N. R. et al. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. *Genome Med.* **8**, 97 (2016).
19. Lourenço, J. et al. Challenges in dengue research: a computational perspective. *Evol. Appl.* **11**, 516-533 (2017).
20. Fernandes Brito A. et al. Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.10.20172247v1> (2020).
21. Torres, M. C. et al. Re-introduction of dengue virus serotype 2 in the state of Rio de Janeiro after almost a decade of epidemiological silence. *PLoS ONE* **14**, e0225879 (2019).
22. Goes de Jesus, J. et al. Genomic detection of a virus lineage replacement event of dengue virus serotype 2 in Brazil, 2019. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **115**, e190423 (2020).
23. Quick, J. et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* **12**, 1261-1276 (2017).
24. Borcherding, R. K. et al. Impacts of Zika emergence in Latin America on endemic dengue transmission. *Nat. Commun.* **10**, 5730 (2019).
25. Petrone, M. E. et al. Asynchronicity of endemic and emerging mosquito-borne disease outbreaks in the Dominican Republic. *Nat. Commun.* **12**, 151 (2021).
26. Allicock, O. M. et al. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 1533-1543 (2012).
27. Bruycker-Nogueira, F., Mir, D., dos Santos, F. B. & Bello, G. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* **45**, 454-460 (2016).
28. dos Santos, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology* **8**, 387 (2011).
29. Dutra, K. R. et al. Molecular surveillance of dengue in Minas Gerais provides insights on Dengue virus 1 and 4 circulation in Brazil. *J. Med. Virol.* **89**, 966-973 (2017).
30. Dejnirattisai, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat. Immunol.* **17**, 1102-1108 (2016).
31. Drummond, B. P., Mondini, A., Schmidt, D. J., Bosch, I. & Nogueira, M. L. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch. Virol.* **157**, 2061-2073 (2012).
32. Nunes, M. R. T. et al. Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2769 (2014).
33. Drummond, B. P. et al. Circulation of different lineages of dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS ONE* **8**, e59422 (2013).
34. Faria, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* **546**, 406-410 (2017).
35. Nunes, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* **13**, 102 (2015).
36. Betts, M. J., Russell, R. B. Amino acid properties and consequences of substitutions. In: Barnes M. R., Gray I. C. *Bioinformatics for Geneticists*. 289-316 (Inglaterra: Wiley-Blackwell, 2003).
37. Faria, N. R. et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential 2018. *Science* **361**, 894-899 (2018).
38. Colizzi, V. et al. Structural transformation to attain responsible BIOSciences (STARBIOS2): protocol for a Horizon 2020 Funded European Multicenter Project to promote responsible research and innovation. *JMIR Res. Protoc.* **8**, e11745 (2019).
39. Hill, S. C. et al. Early genomic detection of cosmopolitan genotype of dengue virus serotype 2, Angola, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 784-787 (2019).
40. Visker, M. et al. Genome detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **35**, 871-873 (2019).
41. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772-780 (2013).
42. Laarson, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* **30**, 3276-3278 (2014).
43. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268-274 (2015).
44. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A. & Jermini, L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **14**, 587-589 (2017).
45. Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L. & Pybus, O. G. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* **2**, vew007 (2016).
46. Suchard, M. A. et al. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* **4**, 1-5 (2018).
47. Baele, G., Li, W. L., Drummond, A. J., Suchard, M. A. & Lemey, P. Accurate model selection of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 239-243 (2013).
48. Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. & Suchard, M. A. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000520 (2009).
49. Obolski, U. et al. MVSE: an R-package that estimates a climate-driven mosquito-borne viral suitability index. *Methods Ecol. Evol.* **10**, 1357-1370 (2019).
50. Bouckaert, R. et al. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003537 (2014).

## Acknowledgements

The authors thank all the members of the Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network (a full list of the participants can be found in the Supplementary Information - Supplementary Table 6). The authors also thank all personnel from the Health Surveillance System of the Brazilian Federal District and from the states of Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, and from Blood Center of Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil) that helped with sampling and epidemiological data collection. This work was supported by Decit, SCTIE, Brazilian Ministry of Health, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq (440685/2016-8, 440856/2016-7 and 421598/2018-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - (88887.130716/2016-00), European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under ZIKAlliance Grant Agreement (734548), STARBIOS (709517), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ (E-26/2002.930/2016), International Development Research Centre (IDRC) Canada (108411-001), European Union's Horizon 2020 under grant agreements ZIKACTION (734857) and ZIKAPLAN (734548). This work was supported in part through National Institutes of Health USA grant U01 AI151698 for the United World Antiviral Research Network (UWARN). MG is supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). VF and TdO are supported by the South African Medical Research Council (MRC-RFA-UFSP-01-2013/UKZN HIVEPI) and the NIH H3ABioNet network, which is an initiative of the Human Health and Heredity in Africa Consortium (H3Africa). ECH is supported by an Australian Research Council Australian Laureate Fellowship (FL170100022). JL is supported by a lectureship from the Department of Zoology, University of Oxford. JX, VF and FCMI is supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. FCMI is also supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). ASA has a scholarship from ZIKA - Announcement MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit /No. 14/2016 - Prevention and Fight against Zika Virus.

## Author contributions

Conception and design: T.E.R.A., M.G., V.F., J.L. and L.C.J.A.; Data collection: T.E.R.A., M.G., V.F., J.X., A.S.A., V.A.N., L.H.F.D., M.A.A.O., V.L.S., A.L.S.M., G.M.C., R.H.S.,



E.CO., J.A.C.J., F.C.M.I., A.N.B.F., A.L.A., R.J., C.F.C.A., J.M.R., R.F.C.S., J.A.S., N.F.O.M., P.L., L.C.V.F., S.K.H., A.M., F.K.B., C.C.V., R.V.C., E.L.L.A., S.F.O.T., A.A.F., F.L.L.C., P.L.S., F.B.N., G.G.C.L.; M.C.S.U.Z., F.M.C.S., C.C.M.G., Z.D.C.F.G., S.N.S., L.A.P., A.N.M., F.M.P., J.J.F.M., A.C.M.S.J., M.M.L., R.M.R.N., A.G.N., V.A.C.A., D.B.R., W.K.O., A.C.M., V.P., Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network, E.C.H., T.d.O., J.L. and L.C.J.A.; Investigations: T.E.R.A., M.G., V.F., J.X., V.A.N., L.H.F.D., M.A.A.O., V.L.S., A.L.S.M., G.M.C., R.H.S., E.CO., J.A.C.J., F.C.M.I., A.N.B.F., A.L.A., R.J., C.F.C.A., J.M.R., R.F.C.S., J.A.S., N.F.O.M., P.L., L.C.V.F., S.K.H., A.M., F.K.B., C.C.V., R.V.C., E.L.L.A., S.F.O.T., A.A.F., F.L.L.C., P.L.S., F.B.N., G.G.C.L.; M.C.S.U.Z., F.M.C.S., C.C.M.G., Z.D.C.F.G., S.N.S., L.A.P., A.N.M., F.M.P., J.J.F.M., A.C.M.S.J., M.M.L., R.M.R.N., A.G.N., V.A.C.A., D.B.R., W.K.O., A.C.M., V.P., Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network, E.C.H., T.d.O., J.L. and L.C.J.A.; Data Analysis: T.E.R.A., M.G., V.F., J.X., A.S.A., L.H.F.D., M.A.A.O., V.L.S., A.L.S.M., G.M.C., R.H.S., E.CO., J.A.C.J., F.C.M.I., A.N.B.F., A.L.A., R.J., C.F.C.A., J.M.R., R.F.C.S., J.A.S., N.F.O.M., P.L., L.C.V.F., S.K.H., A.M., F.K.B., C.C.V., R.V.C., E.L.L.A., S.F.O.T., A.A.F., F.L.L.C., P.L.S., F.B.N., G.G.C.L.; M.C.S.U.Z., F.M.C.S., C.C.M.G., Z.D.C.F.G., S.N.S., L.A.P., A.N.M., F.M.P., J.J.F.M., A.C.M.S.J., M.M.L., R.M.R.N., A.G.N., V.A.C.A., D.B.R., W.K.O., A.C.M., V.P., Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network, E.C.H., T.d.O., J.L. and L.C.J.A.; Writing - Original: T.E.R.A., M.G., V.F., J.X., A.S.A., F.K.B., S.F.O.T., F.B.N., E.C.H., T.d.O., J.L. and L.C.J.A.; Draft Preparation: T.E.R.A., M.G., V.F., J.X., A.S.A., F.K.B., S.F.O.T., F.B.N., E.C.H., T.d.O., J.L. and L.C.J.A.; Revision: T.E.R.A., M.G., V.F., J.X., A.S.A., F.K.B., S.F.O.T., F.B.N., E.C.H., T.d.O., J.L. and L.C.J.A.; Resources: L.C.J.A., L.H.F.D., M.A.A.O., V.L.S., A.L.S.M., R.H.S., E.CO., J.A.C.J., A.N.B.F., S.K.H., A.M., A.L.A., R.J., C.F.C.A., J.M.R., R.F.C.S., J.A.S., N.F.O.M., P.L., L.C.V.F., R.V.C., E.L.L.A., D.B.R., W.K.O. and A.C.M.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22607-0>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.G., J.L. or L.C.J.A.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Shannon Bennett, Emily Gurley and the other anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons

Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Talita Émile Ribeiro Adelino <sup>1,56</sup>, Marta Giovanetti <sup>2,56,57</sup>✉, Vagner Fonseca <sup>2,56</sup>, Joilson Xavier <sup>2</sup>, Álvaro Salgado de Abreu<sup>2</sup>, Valdinete Alves do Nascimento<sup>3</sup>, Luiz Henrique Ferraz Demarchi<sup>4</sup>, Marluce Aparecida Assunção Oliveira<sup>1</sup>, Vinícius Lemes da Silva<sup>5</sup>, Arabela Leal e. Silva de Mello<sup>6</sup>, Gabriel Muricy Cunha<sup>7</sup>, Roselene Hans Santos<sup>8</sup>, Elaine Cristina de Oliveira<sup>9</sup>, Jorge Antônio Chamon Júnior<sup>10</sup>, Felipe Campos de Melo Iani <sup>1</sup>, Ana Maria Bispo de Filippis<sup>2</sup>, André Luiz de Abreu<sup>11</sup>, Ronaldo de Jesus<sup>11</sup>, Carlos Frederico Campelo de Albuquerque<sup>12</sup>, Jairo Mendez Rico<sup>12</sup>, Rodrigo Fabiano do Carmo Said<sup>12</sup>, Joscélio Aguiar Silva<sup>13</sup>, Noely Fabiana Oliveira de Moura<sup>13</sup>, Priscila Leite<sup>13</sup>, Lívia Carla Vinhal Frutuoso <sup>13</sup>, Simone Kashima Haddad<sup>14</sup>, Alexander Martínez<sup>15</sup>, Fernanda Khouri Barreto <sup>16</sup>, Cynthia Carolina Vazquez<sup>17</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>18</sup>, Emerson Luiz Lima Araújo <sup>11</sup>, Stephane Fraga de Oliveira Tosta<sup>2</sup>, Allison de Araújo Fabri<sup>2</sup>, Flávia Löwen Levy Chalhoub<sup>2</sup>, Poliana da Silva Lemos <sup>19</sup>, Fernanda de Bruycker-Nogueira<sup>2</sup>, Gislene Garcia de Castro Lichs<sup>4</sup>, Marina Castilhos Souza Umaki Zardin<sup>4</sup>, Fátima María Cardozo Segovia<sup>20</sup>, Crhistine Cavalheiro Maymone Gonçalves<sup>21</sup>, Zoraida Del Carmen Fernandez Grillo<sup>22</sup>, Svetoslav Nanev Slavov<sup>14</sup>, Luiz Augusto Pereira<sup>5</sup>, Ana Flávia Mendonça<sup>5</sup>, Felicidade Mota Pereira<sup>6</sup>, Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães<sup>8</sup>, Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior<sup>10</sup>, Maricélia Maia de Lima <sup>23</sup>, Rita Maria Ribeiro Nogueira<sup>2</sup>, Aristóteles Góes-Neto<sup>24</sup>, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo<sup>24</sup>, Dario Brock Ramalho<sup>25</sup>, Wanderson Kleber Oliveira <sup>26</sup>, Eduardo Marques Macario<sup>27</sup>, Arnaldo Correia de Medeiros<sup>27</sup>, Victor Pimentel<sup>28</sup>, Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network\*, Edward C. Holmes <sup>29</sup>, Tulio de Oliveira<sup>30</sup>, José Lourenço <sup>31,57</sup>✉ & Luiz Carlos Junior Alcantara <sup>2,57</sup>✉

<sup>1</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Instituto Leonidas e Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>4</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do

Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. <sup>5</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Goiânia, Goiás, Brazil. <sup>6</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil. <sup>7</sup>Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. <sup>8</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral, Recife, Pernambuco, Brazil. <sup>9</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. <sup>10</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>11</sup>Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>12</sup>Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>13</sup>Coordenação Geral das Arboviroses, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>14</sup>Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>15</sup>Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama. <sup>16</sup>Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. <sup>17</sup>Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, Paraguay. <sup>18</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>19</sup>Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil. <sup>20</sup>Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, San Lorenzo, Paraguay. <sup>21</sup>Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. <sup>22</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. <sup>23</sup>Secretaria de Saúde de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil. <sup>24</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>25</sup>Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>26</sup>Hospital das Forças Armadas, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>27</sup>Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>28</sup>Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. <sup>29</sup>Marie Bashir Institute for Infectious Diseases and Biosecurity, School of Life and Environmental Sciences and School of Medical Sciences, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia. <sup>30</sup>KwaZulu-Natal Research Innovation and Sequencing Platform (KRISP), College of Health Sciences, University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa. <sup>31</sup>Department of Zoology, Peter Medawar Building, University of Oxford, Oxford, UK. <sup>32</sup>These authors contributed equally: Talita Émile Ribeiro Adelino, Marta Giovanetti, Vagner Fonseca. <sup>33</sup>These authors jointly supervised this work: Marta Giovanetti, José Lourenço, Luiz Carlos Junior Alcantara. \*A list of authors and their affiliations appears at the end of the paper. <sup>34</sup>email: [giovanetti.marta@gmail.com](mailto:giovanetti.marta@gmail.com); [jose.lourenco@zoo.ox.ac.uk](mailto:jose.lourenco@zoo.ox.ac.uk); [luz.alcantara@ioc.fiocruz.br](mailto:luz.alcantara@ioc.fiocruz.br)

### Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network

Erenilde Marques de Cerqueira<sup>32</sup>, Tiago Graf<sup>33</sup>, Walter Ramalho<sup>34</sup>, Wildo Navegantes<sup>34</sup>, Renato Barbosa Reis<sup>35</sup>, Clara Guerra Duarte<sup>36</sup>, Maira Alves Pereira<sup>36</sup>, Paulo Eduardo de Souza da Silva<sup>36</sup>, Raoni Almeida de Souza<sup>36</sup>, Alex Pauvolid-Corrêa<sup>2</sup>, Anne Aline Pereira de Paiva<sup>2</sup>, Hegger Machado Fritsch<sup>2</sup>, Maria Angélica Mares-Guia<sup>2</sup>, Maria Celeste Torres<sup>2</sup>, Maurício Teixeira Lima<sup>2</sup>, Patrícia Sequeira<sup>2</sup>, William de Almeida Marques<sup>2</sup>, Jorlan Fernandes de Jesus<sup>37</sup>, Felipe Gomes Naveca<sup>3</sup>, Alessandra Lima Silva<sup>24</sup>, Anne Cybelle Pinto<sup>24</sup>, Arun Kumar Jaiswal<sup>24</sup>, Élisson Nogueira Lopes<sup>24</sup>, Francielly Moraes Rodrigues da Costa<sup>24</sup>, Gabriel Quintanilha-Peixoto<sup>24</sup>, Gilson Carlos Soares<sup>24</sup>, Paula Luize Camargos Fonseca<sup>24</sup>, Renan Pedra de Souza<sup>24</sup>, Rodrigo Bentes Kato<sup>24</sup>, Rodrigo Profeta Silveira Santos<sup>24</sup>, Sandeep Tiwari<sup>24</sup>, Wylerson Guimarães Nogueira<sup>24</sup>, Beatriz Senra Álvares da Silva Santos<sup>38</sup>, Bruna Lopes Bueno<sup>38</sup>, Isadora Cristina de Siqueira<sup>33</sup>, Lourdes Farre Vallve<sup>33</sup>, Melina Mosquera Navarro Borba<sup>33</sup>, Alix Sandra Mazzetto<sup>39</sup>, Francisco de Assis Araújo Aguiar<sup>40</sup>, Irenio da Silva Gomes<sup>41</sup>, Jayra Juliana Paiva Alves Abrantes<sup>42</sup>, Luiz Takao Watanabe<sup>9</sup>, Marta Ferreira da Silva Rego<sup>6</sup>, Vanessa Brandão Nardy<sup>6</sup>, Shirlei Ferreira de Aguiar<sup>43</sup>, Fabiana Cristina Pereira dos Santos<sup>44</sup>, Alice Louize Nunes Queiroz<sup>19</sup>, Bruno Tardelli Diniz Nunes<sup>19</sup>, Lívia Carício Martins<sup>19</sup>, Márcio Roberto Teixeira Nunes<sup>19</sup>, Flávia Cristina da Silva Salles<sup>45</sup>, Ingra Morales Claro<sup>45</sup>, Jaqueline Goes de Jesus<sup>45</sup>, Darlan da Silva Cândido<sup>31</sup>, Cintia Marcela Fabbri<sup>46</sup>, Claudia González<sup>15</sup>, Liseth Saéz<sup>15</sup>, María Chen-Germán<sup>15</sup>, Jaime Lagos Barrera<sup>47</sup>, José Ernesto Ramírez-González<sup>48</sup>, Josefina Campos<sup>49</sup>, Noelia Morel Faller<sup>50</sup>, Marta Eugenia Viquez Villalobos<sup>51</sup>, Roberto Kaslin<sup>52</sup>, Silvia Paola Salgado Cisneros<sup>52</sup>, Flávia Figueira Aburjaile<sup>53</sup>, Carolina Dourado Amaral<sup>25</sup>, Danielle Bandeira Costa de Sousa Freire<sup>27</sup>, Laura Nogueira Cruz<sup>27</sup>, Daniel Mattos<sup>54</sup>, Leandro Ferreira Lopes Landeira<sup>54</sup>, Mariane Talon de Menezes<sup>54</sup>, Ieda Maria Orioli<sup>54</sup>, Ariane Coelho Ferraz<sup>55</sup>, Daiane Teixeira de Oliveira<sup>55</sup>, Alexandre Barbosa Reis<sup>55</sup>, Renata Guerra de Sá Cota<sup>55</sup>, Rafael dos Santos Bezerra<sup>14</sup>, Melissa Barreto Falcão<sup>23</sup> & Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho<sup>24</sup>

<sup>32</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Salvador, Bahia, Brazil. <sup>33</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil. <sup>34</sup>Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil. <sup>35</sup>Universidade Salvador, Salvador, Bahia, Brazil. <sup>36</sup>Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>37</sup>Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>38</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>39</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. <sup>40</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil. <sup>41</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>42</sup>Laboratório Central de Saúde



Pública do Estado do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. <sup>43</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>44</sup>Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>45</sup>Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>46</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio Maiztegui, Pergamino, Argentina. <sup>47</sup>Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile. <sup>48</sup>Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Báez, Ciudad de México, México. <sup>49</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr Carlos G Malbrán, Buenos Aires, Argentina. <sup>50</sup>Ministerio de Salud Pública de Uruguay, Montevideo, Uruguay. <sup>51</sup>Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza em Nutrición y Salud, Tres Ríos, Costa Rica. <sup>52</sup>Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr Leopoldo Izquieta Pérez, Guayaquil, Ecuador. <sup>53</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. <sup>54</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>55</sup>Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

### **3.2 Vigilância genômica da transmissão de ZIKV na região centro-oeste do Brasil**

Artigo *A Retrospective Overview of Zika Virus Evolution in the Midwest of Brazil*, publicado na revista *Microbiology Spectrum*: GIOVANETTI et al (2022).



# A Retrospective Overview of Zika Virus Evolution in the Midwest of Brazil

Marta Giovanetti,<sup>a,b</sup> Luiz Augusto Pereira,<sup>c</sup> Talita Émile Ribeiro Adelino,<sup>d</sup> Vagner Fonseca,<sup>e</sup> Joilson Xavier,<sup>b</sup> Allison de Araújo Fabri,<sup>a</sup> Svetoslav Nanev Slavov,<sup>f</sup> Poliana da Silva Lemos,<sup>g</sup> William de Almeida Marques,<sup>a</sup> Simone Kashima,<sup>f</sup> José Lourenço,<sup>h</sup> Tulio de Oliveira,<sup>i</sup> Carlos Frederico Campelo de Albuquerque,<sup>e</sup> Carla Freitas,<sup>j</sup> Cassio Roberto Leonel Peterka,<sup>g</sup> Rivaldo Venancio da Cunha,<sup>k</sup> Ana Flávia Mendonça,<sup>c</sup> Vinicius Lemes da Silva,<sup>c</sup> Luiz Carlos Junior Alcantara<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup>Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, Brasília, Brazil

<sup>f</sup>University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>g</sup>Coordenação Geral das Arboviroses, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (CGARB/SVS-MS), Brasília, Brazil

<sup>h</sup>Department of Zoology, Peter Medawar Building, University of Oxford, Oxford, UK

<sup>i</sup>School for Data Science and Computational Thinking, Faculty of Science and Faculty of Medicine and Health Sciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa

<sup>j</sup>Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (CGLAB/SVS-MS), Brasília, Brazil

<sup>k</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Marta Giovanetti, Luiz Augusto Pereira, Talita Émile Ribeiro Adelino, and Vagner Fonseca Denote contributed equally to this article. Author order was determined on the basis of type of contribution.

**ABSTRACT** Since the introduction of the Zika virus (ZIKV) into Brazil in 2015, its transmission dynamics have been intensively studied in many parts of the country, although much is still unknown about its circulation in the midwestern states. Here, using nanopore technology, we obtained 23 novel partial and near-complete ZIKV genomes from the state of Goiás, located in the Midwest of Brazil. Genomic, phylogenetic, and epidemiological approaches were used to retrospectively explore the spatiotemporal evolution of the ZIKV-Asian genotype in this region. As a likely consequence of a gradual accumulation of herd immunity, epidemiological data revealed a decline in the number of reported cases over 2018 to 2021. Phylogenetic reconstructions revealed that multiple independent introductions of the Asian lineage have occurred in Goiás over time and revealed a complex transmission dynamic between epidemic seasons. Together, our results highlight the utility of genomic, epidemiological, and evolutionary methods to understand mosquito-borne epidemics.

**IMPORTANCE** Despite the considerable morbidity and mortality of arboviral infections in Brazil, such as Zika, chikungunya, dengue fever, and yellow fever, our understanding of these outbreaks is hampered by the limited availability of genomic data to track and control the epidemic. In this study, we provide a retrospective reconstruction of the Zika virus transmission dynamics in the state of Goiás by analyzing genomic data from areas in Midwest Brazil not covered by other previous studies. Our study provides an understanding of how ZIKV initiates transmission in this region and reveals a complex transmission dynamic between epidemic seasons. Together, our results highlight the utility of genomic, epidemiological, and evolutionary methods to understand mosquito-borne epidemics, revealing how this toolkit can be used to help policymakers prioritize areas to be targeted, especially in the context of finite public health resources.

**KEYWORDS** Zika virus, Asian lineage, Midwest Brazil, genomic epidemiology

**Editor** Tino Polen, Forschungszentrum Jülich GmbH

**Copyright** © 2022 Giovanetti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Luiz Carlos Junior Alcantara, [luiz.alcantara@ioc.fiocruz.br](mailto:luiz.alcantara@ioc.fiocruz.br).

The authors declare no conflict of interest.

**Received** 13 January 2022

**Accepted** 10 February 2022

**Published** 7 March 2022

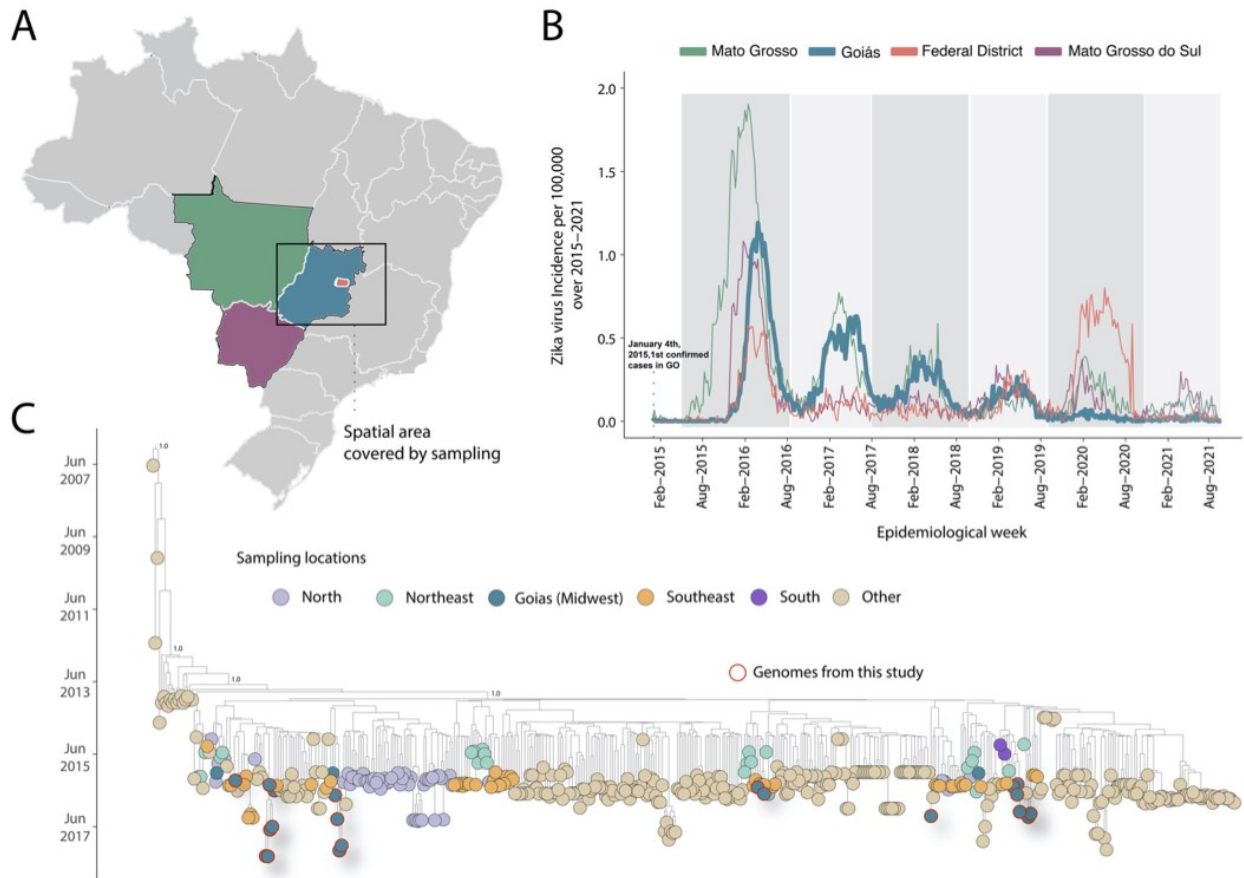
The Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus that was first identified in Uganda in 1947 (1). Outbreaks of ZIKV infection have already been recorded in Africa, Asia, the Pacific, and the Americas (2, 3). The first confirmed case of ZIKV infection in the Americas was reported in Northeast Brazil in May 2015 (4), although phylogenetic studies indicate virus introduction much earlier (2013 to 2014) (5). Since then, the virus has spread throughout the Americas, probably due to a combination of several factors, including a completely susceptible population, favorable climatic conditions for the adequacy of the *Aedes aegypti* mosquitoes as main vectors for its transmission, and sustained human mobility (6–8). Between January 2016 and December 2018, the Brazilian Midwestern region, which covers an area of 1.6 million km<sup>2</sup> and is inhabited by about 14 million people in 467 municipalities, reported a total number of 54,457 Zika cases (9–14). Most of these cases (55%) were reported in the states of Mato Grosso and Goiás, across several epidemic seasons (9–14). Despite some work done over the large epidemic between 2015 and 2016, there is still a paucity of studies directly investigating the circulation and genetic diversity of the ZIKV in this region. In this study, using our experience with mobile laboratory (15), we used nanopore sequencing to generate ZIKV genomes from infected patients residing in Goiás and provide a retrospective reconstruction of its transmission dynamics in that state.

## RESULTS

The 23 sequenced samples obtained in this study were collected from females (65%) and males (35%) (Table S1) with a median age of 30 years (range: 19 to 57). All sequenced samples were collected from different municipalities in the state of Goiás (Table S1, Fig. 1A) and contained sufficient viral genetic material ( $\geq 2$  ng/ $\mu$ L) for library preparation. Cycle threshold ( $C_T$ ) values were on average 27.96 (range: 25 to 32), and sequences presented a median genome coverage of 82.5% (range: 56.1 to 93.2). Epidemiological data and sequencing statistics are detailed in Table S1.

Figure 1B shows the ZIKV weekly cases normalized per 100,000 individuals notified between 2015 and 2021 in the Brazilian Midwest region (Federal District and the states of Mato Grosso, Goiás, and Mato Grosso do Sul). This weekly reported incidence revealed a major outbreak in the Midwest region during 2015 to 2016, after which ever smaller epidemics took place over the years but the virus persisted through year-round transmission cycles. Overall, the state of Goiás reported the lowest incidence in recent years (2020 to 2021). Interestingly, the Federal District, which experienced the smallest initial outbreaks in 2015 to 2016, later presented a temporary resurgence in 2019 to 2020 (Fig. 1B). Over this period, the cumulative number of cases per 100,000 was 17 for the state of Goiás, 36 for the state of Mato Grosso, and 35 for the state of Mato Grosso do Sul. Although we did not assess the factors dictating the general trend in decreasing incidence over the years, it is likely to have been mediated by the accumulating herd immunity in the region since the virus's introduction (16). Indeed, some studies have demonstrated this effect in other Brazilian states (16, 17).

To accurately establish evolutionary relationships among the newly generated sequences and other known ZIKV isolates, we subjected a combined data set to phylogenetic inference. A regression of genetic divergence from root to tip against sampling dates confirmed sufficient temporal signal (coefficient correlation = 0.70,  $r^2 = 0.50$ ). Our maximum clade credibility (MCC) tree showed that the newly sequences obtained in this study are scattered throughout the tree and clustered together with viral strains isolated in other Brazilian regions (northeastern and southeastern), suggesting that those regions have likely acted as steppingstone spots for the dissemination of the virus into the state of Goiás (Fig. 1C), which might have been influenced by the increased human mobility and vector suitability. From our time-measured tree, we estimated the time of the most recent common ancestor (TMRCA) to have occurred between mid-February 2014 (95% highest posterior density ranging from 10 February 2014 to 10 October 2014) for the first introduction event and late November 2016 (95% highest posterior density ranging from 30 May 2016 to 1 January 2017) for the last event,



**FIG 1** Genomic epidemiology of ZIKV in Midwest Brazil. (A) Map of Brazil showing the spatial area under investigation. (B) Weekly notified Zika cases normalized per 100,000 individuals in the Brazilian Midwest region (Federal District and the states of Mato Grosso, Goiás, and Mato Grosso do Sul) between 2015 and 2021. Epidemic curves are colored according to geographical locations. Incidence (cases per 100,000 population) is presented in  $\log_{10}$  for visual purposes. (C) Time-scaled maximum clade credibility tree of ZIKV-Asian lineage in Brazil, including the 23 new genomes generated in this study plus  $n = 479$  reference strains sampled worldwide. Tips are colored according to the sample source location. Values around nodes represent posterior probability support of the tree nodes inferred under Bayesian evolutionary analysis using a molecular clock approach.

suggesting the persistence of the initially introduced virus for the period of 2 years in which reported incidence was highest (2015 to 2016).

## DISCUSSION

To retrospectively explore the retrospective spatiotemporal evolution of ZIKV through the Midwestern Brazilian region, we generated 23 partial and near-complete genome sequences from the 2016 to 2018 ZIKV epidemic. Epidemiological data revealed that epidemic waves from the Brazilian Midwest region displayed their largest sizes between 2015 and 2017 (Fig. 1B). This was followed by a reduction in the number of reported cases over 2018 to 2021, likely a consequence of an expected, gradual accumulation of herd immunity, but the persistence of the initially introduced virus lineage through year-round transmission cycles was still indicated.

We found that the ZIKV epidemic in Goiás was ignited by multiple independent introduction events which we infer to have occurred between February 2014 and November 2016, most likely from northeastern and then later from southeastern Brazil, where the virus had already been circulating since late October 2013 (2, 5). Those findings are in line with previous studies that suggested that northeastern Brazil played a significant role in the establishment and dissemination of ZIKV in the Americas (2, 5, 18) and further reveal complex transmission dynamics within Brazilian regions. Since



the first ZIKV confirmed case in Goiás was detected on 4 January 2015, our findings further highlight that the virus was cryptically circulated in this region for a period of 11 months, following a pattern that had been observed before during other Zika and dengue epidemics (5, 18).

In summary, our data reveal a complex pattern of ZIKV transmission between epidemic seasons, highlighting that the virus's interregional spread might have been driven by a combination of several factors, including: (i) a completely susceptible population, (ii) favorable climatic conditions, and (iii) a sustained human mobility, as discussed elsewhere (7, 16). Together, those results highlight the utility of genomic, epidemiological, and evolutionary methods to understand mosquito-borne epidemics.

## MATERIALS AND METHODS

**Molecular screening.** Serum samples from 23 individuals presenting symptoms compatible with ZIKV infection were submitted to nanopore sequencing during a mobile genomic surveillance activity, which took place in Midwest Brazil in May 2019, under the scope of the ZIBRA-2 project (<https://www.zibra2project.org/>). Viral RNA was extracted and submitted to a real-time PCR protocol adapted from reference 19 to confirm the previous diagnosis. Samples were selected for local sequencing based on a PCR cycle threshold ( $C_T$ ) of  $<32$  to maximize genome coverage of clinical samples by nanopore sequencing (20) (Table S1).

**cdNA synthesis and multiplex tiling PCR.** Samples were submitted to a cDNA synthesis protocol described previously (20), a multiplex tiling PCR using Q5 high fidelity hot-start DNA polymerase (New England Biolabs), and a ZIKV sequencing primers scheme (20). The thermocycling conditions involved 40 cycles, and reaction conditions were as reported previously (20).

**Library preparation and nanopore sequencing.** Amplicons were purified using 1× AMPure XP beads, and cleaned-up PCR products concentrations were measured using Qubit dsDNA HS assay kit. DNA library preparation was carried out using the ligation sequencing kit and the native barcoding kit (NBD104 and NBD114, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) (20). Sequencing libraries were loaded into an R9.4 flow cell (Oxford Nanopore Technologies). In each sequencing run, we used negative controls to prevent and check for possible contamination with less than 2% mean coverage.

**Generation of consensus sequences.** Raw files were basecalled using Guppy, and barcode demultiplexing was performed using qcat. Consensus sequences were generated by *de novo* assembling using Genome Detective (<https://www.genomedetective.com/>) (21).

**Phylogenetic and Bayesian analysis.** The 23 new genomic sequences reported in this study were initially submitted to a genotyping analysis using the phylogenetic arbovirus subtyping tool, available at <http://genomedetective.com/app/typingtool/zika> (22). Genomic data generated in this study were aligned with a worldwide, larger, and updated data set of ZIKV genome sequences ( $n = 479$ ). Sequences were aligned using MAFFT (23), and preliminary ML-tree was inferred using IQTREE2 (24). Prior to temporal analysis, our data set was also assessed for molecular clock signal in TempEst v1.5.3 (25) following the removal of any potential outliers that may violate the molecular clock assumption. To estimate a time-calibrated phylogeny, we used the Bayesian software package BEASTv.1.10.4 (26), with the Bayesian Skyline tree prior (27) with an uncorrelated relaxed clock and the lognormal distribution (28). Analyses were run in duplicate in BEASTv.1.10.4 (26) for 100 million Markov chain Monte Carlo (MCMC) steps, sampling parameters and trees every 10,000th step. Convergence of MCMC chains was checked using Tracer v.1.7.1 (29). Maximum clade credibility trees were summarized using TreeAnnotator after discarding 10% as burn-in.

**Epidemiological data assembly.** Data of weekly notified ZIKV cases in Brazil, available at the Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (<https://portalsinan.saude.gov.br/>), were supplied by Brazilian Ministry of Health and were plotted using the R software version 3.5.1.

**Data availability.** Newly generated ZIKV sequences have been deposited in GenBank under accession numbers [OL423647](https://doi.org/10.1093/ncbi/ol423647) to [OL423669](https://doi.org/10.1093/ncbi/ol423669).

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, XLSX file, 0.01 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all personnel from Health Surveillance System from the state of Goiás and the Brazilian Ministry of Health that helped with samples, sources, and epidemiological data collection.

Molecular screening and production of ZIKV genomic data: M.G., L.A.P., T.E.R.A., J.X., A.d.E.F., S.N.S., P.d.S.L., W.d.A.M., and S.K.; collected samples and curated metadata: V.F., C.F.C.d.A., C.F., C.R.L.P., A.F.M., and V.L.d.S.; analyzed the data: M.G., V.F., T.E.R.A., J.L.; helped with study design and data interpretation: M.G., T.E.R.A., L.A.P., V.F., J.L., T.d.O.,

R.V.C., A.F.M., V.L.dS., and L.C.J.A.; wrote the initial manuscript, which was reviewed by all authors: M.G., T.E.R.A., J.L., L.C.J.A.

We have no competing interests to disclose.

This research was reviewed and approved by the Ethical Committee of the Pan American World Health Organization (No. PAHO-2016-08-0029) and the Brazilian Ministry of Health (MoH) as part of the arbovirus genomic surveillance efforts within the terms of Resolution 510/2016 of CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Ministério da Saúde; National Ethical Committee for Research, Ministry of Health). Residual anonymized clinical diagnostic samples, with no or minimal risk to patients, were provided for research and surveillance purposes within the terms of Resolution 510/2016 of CONEP. Processing of human samples was approved and the need for participants consent was waived by the Institutional Review Board from the Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz (CEP/CAAE: 90249218.6.1001.5248; approval number 2.998.362).

This work was supported by Decit/SCTIE/BrMoH/CNPq (440685/2016-8 to 421598/2018-2), by CAPES (88887.130716/2016-00), and by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548. J.X. is supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. M.G. is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). J.L. was supported by a Research Lectureship by the Department of Zoology, University of Oxford. Funders had no role in study design, data collection and analysis, writing, and/or decision to publish the manuscript.

## REFERENCES

- Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, Sall AA, Musso D. 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20:1085–1086. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>.
- Faria NR, da Silva Azevedo RdS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Thézé J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, da Silva Vasami FG, de Lima Macedo FL, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz AC, Nunes BT, de Almeida Medeiros DB, Rodrigues DSG, Queiroz ALN, da Silva EVP, Henriques DF, da Rosa EST, de Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LMN, de Brito Smith D, Messina JP, Abade L, Lourenço J, Alcántara LCJ, de Lima MM, Giovanetti M, Hay SI, de Oliveira RS, da Silva Lemos P, de Oliveira LF, de Lima CPS, da Silva SP, de Vasconcelos JM, Franco L, Cardoso JF, da Silva Gonçalves Vianez-Júnior JL, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, et al. 2016. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science* 352:345–349. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036>.
- Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, de Jesus JG, Giovanetti M, Kraemer MUG, Hill SC, Black A, da Costa AC, Franco LC, Silva SP, Wu C-H, Raghwan J, Cauchemez S, Du Plessis L, Verotti MP, de Oliveira WK, Carmo EH, Coelho GE, Santelli ACFS, Vinhal LC, Henriques CM, Simpson JT, Loose M, Andersen KG, Grubaugh ND, Somasekar S, Chiu CY, Muñoz-Medina JE, Gonzalez-Bonilla CR, Arias CF, Lewis-Ximenez LL, Baylis SA, Chieppe AO, Aguiar SF, Fernandes CA, Lemos PS, Nascimento BLS, Monteiro HAO, Siqueira IC, de Queiroz MG, de Souza TR, Bezerra JF, Lemos MR, Pereira GF, Loudal D, Moura LC, Dhalia R, França RF, et al. 2017. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* 546:406–410. <https://doi.org/10.1038/nature22401>.
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885–1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>.
- Faria NR, da Costa AC, Lourenço J, Loureiro P, Lopes ME, Ribeiro R, Alencar CS, Kraemer MUG, Villabona-Arenas CJ, Wu C-H, Thézé J, Khan K, Brent SE, Romano C, Delwart E, Custer B, Busch MP, Pybus OG, Sabino EC, NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS-III). 2017. Genomic and epidemiological characterisation of a dengue virus outbreak among blood donors in Brazil. *Sci Rep* 7:15216. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15152-8>.
- Grubaugh ND, Saraf S, Gangavarapu K, Watts A, Tan AL, Oidtmann RJ, Ladner JT, Oliveira G, Matteson NL, Kraemer MUG, Vogels CBF, Hentoff A, Bhatia D, Stanek D, Scott B, Landis V, Stryker I, Cone MR, Kopp EW, Cannons AC, Heberlein-Larson L, White S, Gillis LD, Ricciardi MJ, Kwal J, Lichtenberger PK, Magnani DM, Watkins DI, Palacios G, Hamer DH, Gardner LM, Perkins TA, Baele G, Khan K, Morrison A, Isern S, Michael SF, Andersen KG, GeoSentinel Surveillance Network. 2019. Travel surveillance and genomics uncover a hidden Zika outbreak during the waning epidemic. *Cell* 178:1057–1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.018>.
- Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, Yi D, Johnson K, Earl L, Marczak LB, Shirude S, Davis Weaver N, Bisanzio D, Perkins TA, Lai S, Lu X, Jones P, Coelho GE, Carvalho RG, Van Bortel W, Marsboom C, Hendrickx G, Schaffner F, Moore CG, Nax HH, Bengtsson L, Wetter E, Tatem AJ, Brownstein JS, Smith DL, Lambrechts L, Cauchemez S, Linard C, Faria NR, Pybus OG, Scott TW, Liu Q, Yu H, Wint GRW, Hay SI, Golding N. 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol* 4:854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>.
- Thézé J, Li T, Du Plessis L, Bouquet J, Kraemer MUG, Somasekar S, Yu G, de Cesare M, Balmaseda A, Kuan G, Harris E, Wu C-H, Ansari MA, Bowden R, Faria NR, Yagi S, Messenger S, Brooks T, Stone M, Bloch EM, Busch M, Muñoz-Medina JE, González-Bonilla CR, Wolinsky S, López S, Arias CF, Bonsall D, Chiu CY, Pybus OG. 2018. Genomic epidemiology reconstructs the introduction and spread of Zika virus in Central America and Mexico. *Cell Host Microbe* 23:855–864. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.017>.
- Brasil Ministério da Saúde. 2017. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. <https://bvsmms.saude.gov.br/arboviroses/>.
- Brasil Ministério da Saúde. 2018. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. <https://bvsmms.saude.gov.br/arboviroses/>.
- Brasil Ministério da Saúde. 2019. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. <https://bvsmms.saude.gov.br/arboviroses/>.
- Brasil Ministério da Saúde. 2020. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. <https://bvsmms.saude.gov.br/arboviroses/>.

13. Brasil Ministério da Saúde. 2021. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_3.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf).
14. Brasil Ministério da Saúde. 2021. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 11, 2021. Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil. [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/26/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_11.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/26/boletim_epidemiologico_svs_11.pdf).
15. Adelino TÊR, Giovanetti M, Fonseca V, Xavier J, de Abreu ÂS, do Nascimento VA, Demarchi LHF, Oliveira MAA, da Silva VL, de Mello ALES, Cunha GM, Santos RH, de Oliveira EC, Júnior JAC, de Melo Iani FC, de Filippis AMB, de Abreu AL, de Jesus R, de Albuquerque CFC, Rico JM, do Carmo Said RF, Silva JA, de Moura NFO, Leite P, Frutuoso LCV, Haddad SK, Martínez A, Barreto FK, Vazquez CC, da Cunha RV, Araújo ELL, de Oliveira Tosta SF, de Araújo Fabri A, Chalhoub FLL, da Silva Lemos P, de Bruycker-Nogueira F, de Castro Lichs GG, Zardin MCSU, Segovia FMC, Gonçalves CCM, Fernandez Grillo ZDC, Slavov SN, Pereira LA, Mendonça AF, Pereira FM, da Magalhães JF, Dos Santos Júnior AdCM, de Lima MM, Nogueira RMR, Góes-Neto A et al. 2021. Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil. *Nat Commun* 12: 2296. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22607-0>.
16. Lourenço J, Maia de Lima M, Faria NR, Walker A, Kraemer MU, Villabona-Arenas CJ, Lambert B, Marques de Cerqueira E, Pybus OG, Alcantara LC, Recker M. 2017. Epidemiological and ecological determinants of Zika virus transmission in an urban setting. *Elife* 9:6–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.29820>.
17. Netto EM, Moreira-Soto A, Pedroso C, Höser C, Funk S, Kucharski AJ, Rockstroh A, Kümmerer BM, Sampaio GS, Luz E, Vaz SN, Dias JP, Bastos FA, Cabral R, Kistemann T, Ulbert S, de Lamballerie X, Jaenisch T, Brady OJ, Drosten C, Sarno M, Brites C, Drexler JF. 2017. High Zika virus seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil limits the potential for further outbreaks. *mBio* 8:e013390-17.
18. Giovanetti M, Faria NR, Lourenço J, Goes de Jesus J, Xavier J, Claro IM, Kraemer MUG, Fonseca V, Dellicour S, Thézé J, da Silva Salles F, Gräf T, Silveira PP, do Nascimento VA, Costa de Souza V, de Melo Iani FC, Castilho-Martins EA, Cruz LN, Wallau G, Fabri A, Levy F, Quick J, de Azevedo V, Aguiar RS, de Oliveira T, Bôto de Menezes C, da Costa Castilho M, Terra TM, Souza da Silva M, Bispo de Filippis AM, Luiz de Abreu A, Oliveira WK, Croda J, Campelo de Albuquerque CF, Nunes MRT, Sabino EC, Loman N, Naveca FG, Pybus OG, Alcantara LC. 2020. Genomic and epidemiological surveillance of Zika virus in the Amazon region. *Cell Rep* 30:2275–2283.
19. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14:1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>.
20. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, Burton DR, Lewis-Ximenez LL, de Jesus JG, Giovanetti M, Hill SC, Black A, Bedford T, Carroll MW, Nunes M, Alcantara LC, Sabino EC, Baylis SA, Faria NR, Loose M, Simpson JT, Pybus OG, Andersen KG, Loman NJ. 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 12:1261–1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>.
21. Vilsker M, Moosa Y, Nooij S, Fonseca V, Ghysens Y, Dumon K, Pauwels R, Alcantara LC, Vanden Eynden E, Vandamme A-M, Deforche K, de Oliveira T. 2019. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 35:871–873. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty695>.
22. Fonseca V, Libin PJK, Theys K, Faria NR, Nunes MRT, Restovic MI, Freire M, Giovanetti M, Cuypers L, Nowé A, Abecasis A, Deforche K, Santiago GA, de Siqueira IC, San EJ, Machado KCB, Azevedo V, Bispo-de Filippis AM, da Cunha RV, Pybus OG, Vandamme A-M, Alcantara LCJ, de Oliveira T. 2019. A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007231. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007231>.
23. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33:511–518. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>.
24. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R. 2020. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol* 37:1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
25. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol* 2:25–98. <https://doi.org/10.1093/ve/vev007>.
26. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4:vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
27. Baele G, Li WLS, Drummond AJ, Suchard MA, Lemey P. 2013. Accurate model selection of relaxed molecular clocks in bayesian phylogenetics. *Mol Biol Evol* 30:239–243. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss243>.
28. Gill MS, Lemey P, Faria NR, Rambaut A, Shapiro B, Suchard MA. 2013. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. *Mol Biol Evol* 30:713–724. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss265>.
29. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29:1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>.



## 4 DISCUSSÃO

Recentemente, os arbovírus têm se tornando motivo de grande preocupação para a saúde pública. Nos últimos anos, tem sido relatada a ocorrência de focos simultâneos de dengue, Zika e chikungunya em uma mesma área geográfica (ROTH et al, 2014), como está sendo observado no território brasileiro, onde ZIKV, CHIKV e YFV estão cocirculando com DENV, a arbovirose de maior impacto no país. Muito disso se deve ao fato desses vírus serem transmitidos principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais (KRAEMER et al, 2015). Outros fatores, como crescimento populacional, urbanização não planejada, globalização da economia com rápido deslocamento da população por meio de viagens aéreas e alterações climáticas também contribuíram para as arboviroses expandirem em escala mundial (SAN MARTIN et al, 2010; CHEN e VASILAKIS, 2011).

A primeira epidemia causada por DENV no Brasil foi documentada em 1982, em Boa Vista (Roraima), onde foram isolados os sorotipos DENV1 e DENV4 (OSANAI et al, 1983). Em 1986, no Rio de Janeiro, foi documentada a reintrodução de DENV1 no Brasil (SCHATZMAYR et al, 1986), com mais de um milhão de casos registrados (FIGUEIREDO et al, 1991). Por sua vez, o sorotipo DENV2 foi introduzido no país em 1990, também no estado do Rio de Janeiro, onde foram descritos os primeiros casos graves (NOGUEIRA et al, 1990). Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com epidemias, geralmente associadas à introdução de novos sorotipos ou à alteração do sorotipo predominante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

Após um período de grandes epidemias, como observado nos anos de 2002, 2008, 2010, 2013, 2015 e 2016, o Brasil registrou um número surpreendentemente baixo de casos de dengue entre 2017 e 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b), um padrão também observado em outros países da América Latina (OPAS, 2018). Importante ressaltar que esse período foi precedido pela introdução e dispersão de ZIKV no país (FARIA et al, 2017), um vírus que pertence a mesma família *Flaviviridae* e compartilha o mesmo mosquito transmissor da doença. Em 2019, uma explosão de notificações de dengue foi registrada, com 1.544.987 casos prováveis e 782 óbitos confirmados até a Semana Epidemiológica 52 (MINISTÉRIO DA SAÚDE,

2019b). A epidemia nesse ano foi caracterizada pela cocirculação de DENV1 e DENV2, este último reemergindo no país após onze anos de baixa circulação (TORRES et al, 2019; GOES DE JESUS et al, 2020; FERNANDES BRITO et al, 2021).

Com o objetivo de explorar a contribuição dos fatores climáticos no cenário epidemiológico de dengue entre 2015 e 2020, estimou-se nesse trabalho o *index p*, uma medida do potencial de transmissão dos mosquitos *Aedes* inferido a partir dos dados de temperatura e umidade (OBOLSKI et al, 2019). As análises mostraram que não houve variação significativa do potencial de transmissão durante esse período, sugerindo que fatores não climáticos podem ter sido responsáveis pelas epidemias de 2015, 2016 e 2019. De forma semelhante, não houve redução do potencial de transmissão durante 2017 e 2018, mostrando que outros fatores, como a imunidade da população, podem ter desempenhado um papel importante na baixa incidência da doença. Esses resultados foram corroborados por um estudo recente conduzido por Fernandes Brito e colaboradores (2021), que ainda destacaram que as medidas de controle implementadas como resposta a epidemia de ZIKV registrada em 2016 podem ter contribuído para a redução do número de casos de dengue em 2017 e 2018.

Perez e colaboradores (2019) também discutiram três hipóteses como sendo responsáveis pela baixa incidência de dengue em 2017: (1) alterações no sistema de vigilância epidemiológica, como mudança na definição de casos; (2) imunidade cruzada causada pela circulação simultânea de diferentes arbovírus e (3) alterações na densidade e competência dos vetores devido às mudanças climáticas ou à intensificação das estratégias de controle. Os autores concluíram que o baixo número de casos de dengue após vários anos de epidemias de diferentes arbovírus pode estar relacionado à imunidade da população e ao aumento das atividades de controle de vetores, apesar de destacarem a necessidade de realização de mais estudos.

As epidemias recentes de DENV nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil foram marcadas pela alteração do sorotipo predominante, onde o DENV1 foi substituído por DENV2. Esse fenômeno, conhecido por substituição de sorotipo, é frequentemente associado à gravidade e ao aumento do número de mortes, devido à maior probabilidade de ocorrência de infecções secundárias na população

(NOGUEIRA et al, 1990; DRUMOND et al, 2012; DUTRA et al, 2017; SALLES et al, 2018; DÍAZ et al, 2019). No presente trabalho, foi descrito um aumento no número absoluto de mortes em 2019, mas não foi observada alteração significativa da taxa de letalidade nas regiões sudeste e centro-oeste em decorrência da emergência de DENV2. Esse padrão pode estar associado à maior conscientização da população sobre a necessidade de buscar atenção médica quando há desenvolvimento de sinais de alarme assim como à sensibilização das equipes de saúde na identificação precoce dos casos graves.

Apesar do Brasil ser considerado hiperendêmico para a dengue, ainda existe limitada informação sobre a epidemiologia genômica do vírus no país. Muitos estudos têm avaliado a dinâmica de DENV nas Américas (ALLICOCK et al, 2012; MIR et al, 2014; BRUYCKER-NOGUEIRA et al, 2016), focando principalmente em estados e/ou municípios únicos (ROMANO et al, 2010; DOS SANTOS et al, 2011; DUTRA et al, 2017) utilizando dados genômicos parciais. Para explorar a história evolutiva e contribuir para o conhecimento sobre a dinâmica das últimas epidemias de DENV no país, foram geradas nesse trabalho 227 novas sequências completas de DENV1 e DENV2, obtidas das três regiões brasileiras que historicamente tem registrado as maiores incidências da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b). Esses novos genomas correspondem a mais da metade das sequências completas de DENV1 e DENV2 do Brasil disponíveis em bancos de dados públicos, embora o país enfrente epidemias de grandes proporções há mais de três décadas.

A reconstrução filogenética realizada nesse trabalho revelou que os novos isolados de DENV1 e DENV2 foram classificados como genótipos V e III, respectivamente, assim como observado em outros estudos (DOS SANTOS et al, 2011; DRUMOND et al, 2012; DRUMOND et al, 2013; NUNES et al, 2014; BRUYCKER-NOGUEIRA et al, 2016; DUTRA et al, 2017; TORRES et al, 2019; GOES DE JESUS et al, 2020; CUNHA et al, 2021; FERNADES BRITO et al, 2021; RIBEIRO et al, 2021). As novas sequências de DENV1-genótipo V, amostradas entre 2015 e 2019, agruparam-se em três clados distintos, sugerindo que as últimas epidemias no Brasil foram caracterizadas pela cocirculação de diferentes linhagens. De forma semelhante, os novos isolados de DENV2-genótipo III, coletados entre 2016 e 2019, formaram dois clados distintos (BR-3 e BR-4), este último agrupando a maior parte das sequências de DENV2-III geradas. As análises também

demonstraram que BR-4 abrange duas linhagens diferentes, BR-4L1 e BR-4L2, que cocircularam entre os anos de 2017 e 2019. Esse padrão de circulação simultânea de diferentes linhagens em uma mesma região já foi descrito anteriormente no Brasil (DOS SANTOS et al, 2011; DRUMOND et al, 2012; DRUMOND et al, 2013) assim como em outros países da América (MENDEZ et al, 2010; CARRILLO-VALENZO et al, 2010) e da Ásia (KUKRETI et al, 2009).

Além da cocirculação, outra característica marcante das epidemias de dengue é a substituição de linhagem, que ocorre quando vírus pertencentes a um mesmo clado que circulou numa região particular por um período de tempo é substituído por outro e o primeiro passa a não ser mais evidenciado, seja pela redução drástica da frequência ou pela extinção. As análises sugeriram que o clado I de DENV1-V foi substituído pelos clados II e III durante a epidemia de 2019 assim como o clado BR-4 de DENV2-III parece estar substituindo BR-3, uma vez que a maior parte das novas sequências agruparam em BR-4. Embora não esteja totalmente entendido, esse fenômeno de substituição pode estar relacionado a variações no *fitness* da população viral ou a eventos estocásticos, como redução da população viral associada com a flutuação sazonal da população e densidade de vetores (HOMES e TWIDDY, 2003; MYAT THU et al, 2005; CHEN e VASILAKIS, 2011).

Para investigar a data de introdução e o local provável de origem do ancestral comum mais recente (tMRCA) dos novos isolados de DENV1-V e DENV2-III (2015-2019), foram realizadas reconstruções filogeográficas utilizando conjuntos de dados atualizados para cada sorotipo compostos pelas sequências recém-geradas e genomas de referência depositados em banco de dados públicos. As análises permitiram estimar que, para DENV1-V, o ancestral comum mais recente foi introduzido na região sudeste, entre maio de 2006 e fevereiro de 2008 para o clado I; na região norte, entre agosto de 2007 e maio de 2010 para o clado II; e, na região sudeste, entre outubro de 2009 e agosto de 2011 para o clado III. A reconstrução filogeográfica do clado BR-4 de DENV2-III sugeriu que o ancestral comum mais recente foi introduzido entre setembro de 2014 e junho de 2016 para BR-4L1 e entre março de 2015 e novembro de 2016 para BR-4L2, ambos com origem provável na região sudeste do Brasil. Apesar dos longos intervalos de tempo refletirem a escassez de sequências de DENV no país e a necessidade de um monitoramento genômico contínuo, as análises filogeográficas realizadas demonstraram que as

regiões sudeste e norte atuaram como importantes fontes de dispersão viral para as outras regiões do Brasil. Esses achados estão de acordo com outros estudos acerca da epidemiologia da dengue, que mostraram o papel fundamental da região sudeste na reemergência de DENV1 em 1986 (OSANAI et al, 1983; SCHATZMAYR et al, 1986) e na introdução de DENV2 e DENV3, em 1990 e 2000, respectivamente (NOGUEIRA et al, 1990; (NOGUEIRA et al, 2001). De forma semelhante, a região norte do Brasil tem grande relevância para a introdução de DENV1 e DENV4 (OSANAI et al, 1983), assim como para a dispersão de outras arboviroses, tais como febre amarela (REZENDE et al, 2018; FARIA et al, 2018) e chikungunya (NUNES et al, 2015).

Outra grande epidemia que atingiu o Brasil nos últimos anos foi provocada pelo ZIKV. Ele foi responsável pelo registro de mais de 256 mil casos no país entre 2015 e 2016, considerado o período mais epidêmico da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; OPAS, 2022). Apesar dos primeiros casos terem sido registrados no nordeste em maio de 2015, estudos filogenéticos estimam que ZIKV foi introduzido no Brasil entre 2013 e 2014, sugerindo que o vírus circulou sem ser detectado no país por mais de 12 meses (FARIA et al, 2016b; FARIA et al, 2017).

Embora tenha sido uma epidemia de grandes proporções causada pela emergência de um vírus que até então tinha circulação registrada principalmente em países africanos e asiáticos, a dinâmica da transmissão de ZIKV em algumas regiões do Brasil foi relativamente pouco explorada. Estudos prévios investigaram a circulação do vírus nas Américas, incluindo o Brasil (FARIA et al, 2016b; METSKY et al, 2017), ou no nosso país, porém focados na região nordeste, considerada o epicentro da epidemia (FARIA et al, 2017), ou em estados ou municípios isolados (NACCACHE et al, 2016; VIEIRA et al, 2019; GIOVANETTI et al, 2020; IANI et al, 2021). Para contribuir para o melhor entendimento acerca da dinâmica de transmissão de ZIKV no centro-oeste, a região brasileira com as maiores incidências da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; OPAS, 2022), foram geradas 23 sequências virais completas ou quase completas e os dados genômicos foram combinados com análises filogenéticas e epidemiológicas para reconstruir a história evolutiva de ZIKV no estado de Goiás.

As análises demonstraram que, assim como observado nas demais regiões brasileiras, o período entre 2015 e 2016 foi aquele com maior registro de casos de

Zika no centro-oeste. Esse período foi seguido por picos menores da doença em 2017, 2018 e 2019 no Distrito Federal e em todos os estados dessa região. Estudos tem sugerido que essa diminuição do número de casos pode estar relacionada ao acúmulo da imunidade de rebanho. De fato, Netto e colaboradores (2017), através de uma avaliação da soroprevalência de Zika em Salvador, observaram que a taxa de imunidade da população aumentou rapidamente a partir de 2015, alcançando 63% da população local em 2016. De forma semelhante, Lourenço e colaboradores (2017), utilizando os dados de casos notificados e um modelo matemático da dinâmica de transmissão da doença, estimaram que cerca de 65% da população local de Feira de Santana, na Bahia, tenha sido infectada por ZIKV em 2015. Tais estimativas estão também de acordo com as taxas de infecção viral registradas durante as epidemias de ZIKV na Ilha de Yap (cerca de 73%) e na Polinésia Francesa (cerca de 66%) (DUFFY et al, 2009; CAUCHEMEZ et al, 2016). Apesar da imunidade de rebanho ter desempenhado um papel fundamental na redução do número de casos de Zika ao longo dos anos, é possível que outros fatores, como as medidas de combate ao mosquito vetor, conscientização da população, similaridade com outras arboviroses ou até mesmo alterações no sistema de vigilância, também possam ter contribuído para o baixo número de notificações nos últimos anos (PERKINS, 2017; LOWE et al, 2018).

Como esperado, a reconstrução filogenética dos isolados de ZIKV gerados nesse estudo combinado com dados genômicos disponíveis em bancos de dados públicos revelou que todas as 23 novas sequências de Goiás pertencem ao genótipo asiático, assim como observado em outros estudos realizados no Brasil (ZANLUCA et al, 2015; FARIA et al, 2016b; NACCACHE et al, 2016; FARIA et al, 2017; METSKY et al, 2017; VIEIRA et al, 2019; GIOVANETTI et al, 2020; IANI et al, 2021). As novas sequências de ZIKV, amostradas entre 2016 e 2018, agruparam-se em clados distintos, sugerindo que a epidemia em Goiás foi causada por múltiplos eventos de introdução de ZIKV, que ocorreram entre fevereiro de 2014 e novembro de 2016. Estas análises também indicam que, após a sua primeira introdução, ZIKV circulou de forma críptica na região por cerca de 11 meses até ser detectado pela primeira vez em 4 de janeiro de 2015. Essa circulação críptica pode estar relacionada ao elevado número de infecções assintomáticas e também à enorme

dificuldade de distinguir Zika de outras arboviroses, tais como dengue e chikungunya (COSTA et al, 2020).

Adicionalmente, os novos isolados foram agrupados com sequências brasileiras provenientes do nordeste e sudeste, sugerindo que essas regiões provavelmente atuaram como fontes de disseminação de ZIKV para o estado de Goiás. Esses achados corroboram estudos anteriores que apontaram a região nordeste como importante local para estabelecimento e disseminação de ZIKV nas Américas e no Brasil (FARIA et al, 2016b; FARIA et al, 2017; GIOVANETTI et al, 2020; COSTA et al, 2020) e destaca mais uma vez o papel fundamental da região sudeste na disseminação de ZIKV e outras arboviroses no país (OSANAI et al, 1983; SCHATZMAYR et al, 1986; NOGUEIRA et al, 1990; NOGUEIRA et al, 2001).

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram gerados 250 novos genomas completos e quase completos de DENV1, DENV2 e ZIKV circulantes no Brasil para explorar a epidemiologia molecular desses vírus durante as epidemias recentes no país. As análises filogenéticas indicaram que esses isolados pertencem aos genótipos DENV1-V, DENV2-III e ZIKV-asiático, com circulação sustentada no território brasileiro há bastante tempo.

Os resultados demonstraram uma complexa dinâmica de transmissão de DENV1 e DENV2, marcada por característicos fenômenos de substituição e cocirculação de diferentes linhagens virais. Um padrão similar de cocirculação de linhagem foi observado durante a epidemia de ZIKV na região centro-oeste do Brasil, caracterizada por múltiplas introduções do vírus ao longo do tempo. Destacou-se também a importância das regiões norte, sudeste e nordeste do país como fontes de disseminação viral, sugerindo que um quadro de vigilância ativa nessas regiões é essencial para o controle das epidemias de DENV e ZIKV no Brasil. Além disso, tais resultados são consistentes com a existência de condições ecológicas favoráveis à manutenção dos vetores *Aedes*, que aliado à insuficiente imunidade de rebanho da população, desempenharam importante papel no cenário epidemiológico de dengue entre os anos de 2015 e 2019.

Por fim, destacamos a abordagem de vigilância genômica como uma estratégia fundamental para monitoramento da transmissão viral e melhor entendimento de suas epidemias, fatores cruciais para a implementação de medidas de controle efetivas, especialmente importantes quando vacinas e/ou tratamento específico não estão disponíveis.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLICOCK OM et al. (2012). Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol Biol Evol* 29, 1533–154.

BESNARD M et al. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 19, 20751.

BOLLATI M et al. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res* 87, 125-148.

BRUYCKER-NOGUEIRA F et al. (2016). Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect Genet Evol* 45, 454–460.

BUATHONG R et al. (2015). Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. *Am J Trop Med Hyg* 93, 380–383.

CALVET G et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 16, 653–660.

CARRILLO-VALENZO E et al. (2010). Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol* 155, 1401–1412.

CAUCHEMEZ S et al. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet* 387, 2125–2132.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2021. About Dengue: What you need to know. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>>. Acesso em: 21 de novembro de 2021.

CHAMBERS TJ et al. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44, 649 –688.

CHEN LH. (2016). Zika virus infection in a Massachusetts resident after travel to Costa Rica: a case report. *Ann Intern Med* 8, 574–576.

CHEN R, VASILAKIS N. (2011). Dengue—quo tu et quo vadis? *Viruses* 3, 1562–1608.

CHERIAN S et al. (2021). SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms* 9, 1542.

CHOUDHURY MA et al. (2014). Distribution of fitness in populations of dengue viruses. *PLoS One* 9, e107264.

CLYDE K et al. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80, 11418–31.

COSTA LC et al. (2020). New Insights on the Zika Virus Arrival in the Americas and Spatiotemporal Reconstruction of the Epidemic Dynamics in Brazil. *Viruses* 13, 12.

CUNHA MDP et al. (2021). Systemic dengue infection associated with a new dengue virus type 2 introduction in Brazil - a case report. *BMC Infect Dis* 21, 311.

DÍAZ Y et al. (2019). Molecular Epidemiology of Dengue in Panama: 25 Years of Circulation. *Viruses* 11, 764.

DICK GW et al. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46, 509–520.

DICK OB et al. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 87, 584–593.

DOS SANTOS FB et al. (2011). First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology Journal* 8, 387.

DRUMOND BP et al. (2012). Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by cocirculation and strain/lineage replacement. *Arch Virol* 157, 2061–2073.

DRUMOND BP et al. (2013). Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One* 8, e59422.

DUDAS G et al. (2017). Virus Genomes Reveal Factors That Spread and Sustained the Ebola Epidemic. *Nature* 544, 309–315.

DUFFY MR et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360, 2536–2543.

DUTRA KR et al. (2017). Molecular surveillance of dengue in Minas Gerais provides insights on Dengue virus 1 and 4 circulation in Brazil. *J Med Virol* 89, 966–973.

ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2015). Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>>. Acesso em 22 de abril de 2022.

FARIA NR et al. (2016a). Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. *Genome Medicine* 8, 97.

FARIA NR et al. (2016b). Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 352, 345–349.

FARIA NR et al. (2017). Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* 546, 406–410.

FARIA NR et al. (2018). Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361, 894–899.

FARIA NR et al. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372, 815–821.

FERNANDES BRITO A et al. (2021). Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. *Nat Commun* 12, 2619.

FIGUEIREDO LTM et al. (1991). Encuesta serológica sobre el dengue entre escolares de Rio de Janeiro. Brasil, 1986 y 1987. *Bol Oficina Sanit Panam* 111, 525-533.

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

FOY BD et al. (2011). Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 17, 880–882.

GEROLD G et al. (2017). Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. *Mol Cell Proteomics* 16, S75-S91.

GIOVANETTI M et al. (2020). Genomic and Epidemiological Surveillance of Zika Virus in the Amazon Region. *Cell Rep* 30, 2275–2283.e7.

GIOVANETTI M et al. (2022). Genomic epidemiology reveals the impact of national and international restrictions measures on the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. medRxiv. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.10.07.21264644v2>>. Acesso em: 09 de maio de 2022.

GOES DE JESUS J. et al. (2020). Genomic detection of a virus lineage replacement event of dengue virus serotype 2 in Brazil, 2019. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 115, e190423.

GOURINAT AC et al. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 21, 84–86.

GUBLER DJ. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbial Rev* 11, 480–496.

GUBLER DJ. (2006). Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* 277, 3–16; discussion 16–22, 71–3, 251–3.

GUBLER DJ. (2014). Dengue Viruses: Their Evolution, History and Emergence as a Global Public Health Problem. In: GUBLER DJ, OOI EE, VASUDEVAN S, FARRAR J editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, 2nd ed. CABI, London, UK. p. 1–29.

GUZMAN MG et al. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8, S7–16.

HADDOW AJ et al. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (stegomyia) africanus (theobald)* taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ* 31, 57–69.

HADDOW AD et al. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1477.

HALSTEAD SB et al. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 42, 311–328.

HALSTEAD SB, O'ROURKE E.J (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146, 201–217.

HAMMON WM et al. (1960). Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 131, 1102–1103.

HARAPAN H et al. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses* 12, 1-35.

HARRIS E et al. (2000). Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 63, 5–11.

HEALTHMAP. (2021). DengueMap. Disponível em: <<https://www.healthmap.org/dengue/en/>>. Acesso em: 23 de outubro de 2021

HENNESSEY M et al. (2016). Zika virus spreads to new areas - region of the Americas, May 2015 - January 2016. *MMWR Morb Wkly Rep* 65, 6555–6558.

HIGUERA A, RAMÍREZ JD. (2019). Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Trop* 190, 99-111.

HOLMES EC, TWIDDY SS. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 3, 19–28.

HOTTA S. (1952). Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J Infect Dis* 90, 1–9.

IANI FCM et al. (2021). Epidemiology and evolution of Zika virus in Minas Gerais, Southeast Brazil. *Infect Genet Evol* 91, 104785.

IOOS S et al. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 44, 302–307.

KRAEMER MUG et al. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife* 4, 08347.

KUKRETI H et al. (2009). Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. *Viol J* 6, 1.

KUTSUNA S et al. (2014). Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. *Euro Surveill* 19, 1–4.

LEITMEYER KC et al. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73, 4738–4747.

LEPARC-GOFFART I et al. (2014). Chikungunya in the Americas. *Lancet* 383, 514.

LINDENBACH BD et al. (2013). Flaviviridae, 712–746. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields Virology* vol 1, 6th ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

LOURENÇO J et al. (2017). Epidemiological and ecological determinants of Zika virus transmission in an urban setting. *Elife* 6, e29820.

LOWE R et al. (2018). The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *Int J Environ Res Public Health* 15, 96.

MACNAMARA FN. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48, 139–145.

MARCHETTE NJ et al. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 18, 411–415.

MARTINES RB et al. (2016). Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65, 159–160.

MENDEZ JÁ et al. (2010). Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Viol J* 7, 226.

MESSER WB et al. (2003). Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9, 800–809.

METSKY HC, et al. (2017). Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* 546, 411–415.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2002). Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue\\_aspecto\\_epidemiologicos\\_diagnostico\\_tratamento.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_aspecto_epidemiologicos_diagnostico_tratamento.pdf)>. Acesso em 25 de janeiro de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2015). Procedimentos preliminares a serem adotados para a vigilância dos casos de microcefalia no Brasil. Nota Informativa nº 01/2015. Disponível em: <<http://www.cosemspa.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2015/11/microcefalia-nota-informativa-17nov2015-c-1.pdf>>. Acesso em 22 de abril de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2016a). Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>>. Acesso em 25 de janeiro de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2016b). Procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do vírus Zika no Brasil. Nota Informativa. Disponível em: <[https://www.conasems.org.br/wpcontent/uploads/2016/03/portalsaude.saude.gov.br\\_images\\_pdf\\_2016\\_marco\\_07\\_Nota-Informativa-zika.pdf](https://www.conasems.org.br/wpcontent/uploads/2016/03/portalsaude.saude.gov.br_images_pdf_2016_marco_07_Nota-Informativa-zika.pdf)>. Acesso em 23 de abril de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2017a). Guia de Vigilância em Saúde. 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>>. Acesso em 28 de maio de 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2017b). Saúde Brasil 2015/2016 - Uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_brasil\\_2015\\_2016\\_analise\\_zika.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2015_2016_analise_zika.pdf)>. Acesso em: 23 de abril de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2019a). Guia de Vigilância em Saúde. 3. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <[https://renastonline.ensp.fiocruz.br/sites//default/files/arquivos/recursos/guia\\_vigilancia\\_saude\\_volume\\_unico\\_3ed.pdf](https://renastonline.ensp.fiocruz.br/sites//default/files/arquivos/recursos/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3ed.pdf)>. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2019b). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Boletim Epidemiológico, set 2019, 50:1-154. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2020a). Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletimepidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>. Acesso em 26 de janeiro de 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2020b). Zika vírus. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus>>. Acesso em 22 de abril de 2022.

MIR D et al. (2014). Spatiotemporal dynamics of DENV-2 Asian-American genotype lineages in the Americas. *PLoS One* 9, e98519.

MUSSO D et al. (2014a). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 19, 20761.

MUSSO D et al. (2014b). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* 20, O595–O596.

MUSSO D et al. (2015a). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21, 359–361.

MUSSO D et al. (2015b). Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol* 68, 53–55.

MUSSO D et al. (2019). Zika Virus Infection - After the Pandemic. *N Engl J Med* 381, 1444–1457.

MYAT THU H et al. (2005). Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. *Virology* 336, 163–172.

NACCACHE SN et al. (2016). Distinct Zika Virus Lineage in Salvador, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 22, 1788–1792.

NETTO EM et al. (2017). High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *mBio* 8, e01390–17.

NOGUEIRA RM et al. (1990). Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85, 253.

NOGUEIRA RM et al. (2001). Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 925–926.

NUNES MR et al. (2014). Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2769.

NUNES MR et al. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med* 13, 102.

OBOLSKI U et al. (2019). MVSE: an R-package that estimates a climate-driven mosquito-borne viral suitability index. *Methods Ecol Evol* 10, 1357–1370.

OEHLER E et al. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* 19, 20720.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. (1947). Directing Council Resolution CD1 R1. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/1733/CD1.R1en.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. (2018). Epidemiological Alert Dengue. Disponível em <<https://www.paho.org/en/documents/21-november-2018-dengue-epidemiological-alert>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. (2021). Dengue cases. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=1>>. Acesso em 23 de outubro de 2021.



ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. (2022). PLISA – Plataforma de Información en Salud para las Américas, Zika. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-zika.html>>. Acesso em: 23 de abril de 2022.

OSANAI CH et al. (1983). Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima – Nota prévia. *Rev. Inst Med Trop São Paulo* 25, 53–54.

PEREZ F et al (2019). The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. *Trop Med Int Health* 24, 442–453.

PERKINS TA. Retracing Zika's footsteps across the Americas with computational modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 5558–5560.

PIERSON TC, DIAMOND MS. (2013). Flaviviruses, 747–794. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields Virology* vol 1, 6th ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

PINHEIRO FP, CORBER SJ. (1997). Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 50, 161.

PINTO JUNIOR VL et al. (2015). Vírus Zika: Revisão para Clínicos [Zika Virus: A Review to Clinicians]. *Acta Med Port* 28, 760–765.

QUICK J et al. (2016). Real-time portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530, 228–232.

RAWAL G et al. (2016). Zika virus: An overview. *J Family Med Prim Care* 5, 523–527.

REITER P et al. (2006). *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infect Dis* 6, 463–464.

REZENDE IM et al. (2018). Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006538.

RIBEIRO GO et al. (2021). Adaptive Evolution of New Variants of Dengue Virus Serotype 1 Genotype V Circulating in the Brazilian Amazon. *Viruses* 13, 689.

RICE CM et al. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726–733.

RICO-HESSE R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174, 479–493.

RIGAU-PEREZ JG et al. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352, 971–977.

RIGAU-PÉREZ JG. (2006). Severe dengue the need for new cases definitions. *Lancet* 6, 297–302.

RODRIGUEZ-ROCHE R, GOULD EA. (2013). Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Res Int* 2013, 690835.

ROMANO CM et al. (2010). Characterization of Dengue Virus Type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One* 5, e11811.

ROTH A et al. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill* 19, 20929.

SABIN AB. (1952). Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1, 3050.

SALLES TS et al. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasit Vectors* 11, 264.

SAMPATHKUMAR P, SANCHEZ JL. (2016). Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. *Mayo Clin Proc* 91, 514–521.

SAN MARTIN JL et al. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82, 128–135.

SCHATZMAYR HG et al. (1986). An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81, 245–246.

SHEN S et al. (2016). Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virology* 31, 118–130.

SHURTLEFF AC et al. (2001). Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology* 281, 75–87.

SIKKA V et al. (2016). The Emergence of Zika Virus as a Global Health Security Threat: A Review and a Consensus Statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *J Glob Infect Dis* 8, 3–15.

SOUZA RV et al. (1995). An outbreak of Dengue in the state of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90, 345–346.

TEIXEIRA MG et al. (2009). Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saúde Pública* 25, S7–18.

TOGNARELLI J et al. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol* 161, 665–668.

TORRES MC et al. (2019). Re-introduction of dengue virus serotype 2 in the state of Rio de Janeiro after almost a decade of epidemiological silence. *PLoS ONE* 14, e0225879.

TSETSARKIN KA et al. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3, e201.

TWIDDY SS et al. (2003). Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* 20, 122–129.

USME-CIRO JA et al. (2014). The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval. *Hum Vaccin Immunother* 10, 2674–2678.

VASCONCELOS PFC. 2003. Yellow fever. *Rev Soc Bras Med Trop* 36, 275–293.

VASILAKIS N, WEAVER SC. (2008). The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 72, 1–76.

VIANA R et al. (2022). Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature* 603, 679–686.

VIEIRA CJDSP et al. (2019). Spread of two Zika virus lineages in Midwest Brazil. *Infect Genet Evol* 75, 103974.

WHITEHEAD SS et al. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 5, 518–528.

WILSON ME, CHEN LH. (2002). Dengue in the Americas. WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/163755>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 23 de outubro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017). Situation Report - Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254714/zikasitrep10Mar17eng.pdf;jsessionid=517333B2B8FAF42C02D0FAFA41CF55FF?sequence=1>>. Acesso em: 23 de abril de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2021). Dengue and severe dengue. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 23 de outubro de 2021.

XAVIER J, et al. (2021). Classification of Zika virus sequences with respect to their species and subspecies, 29–37. In Colin R et al (ed), Zika Virus Impact, Diagnosis, Control, and Models, vol 2. Academic Press.

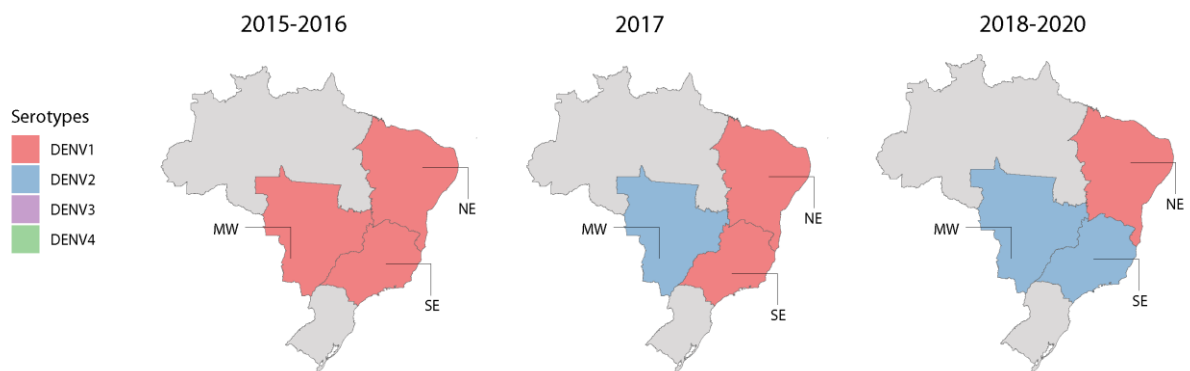
ZANLUCA C, DOS SANTOS CN. (2016). Zika virus - an overview. *Microbes Infect* 18, 295–301.

ZANLUCA C et al. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110, 569–572.

## APÊNDICES

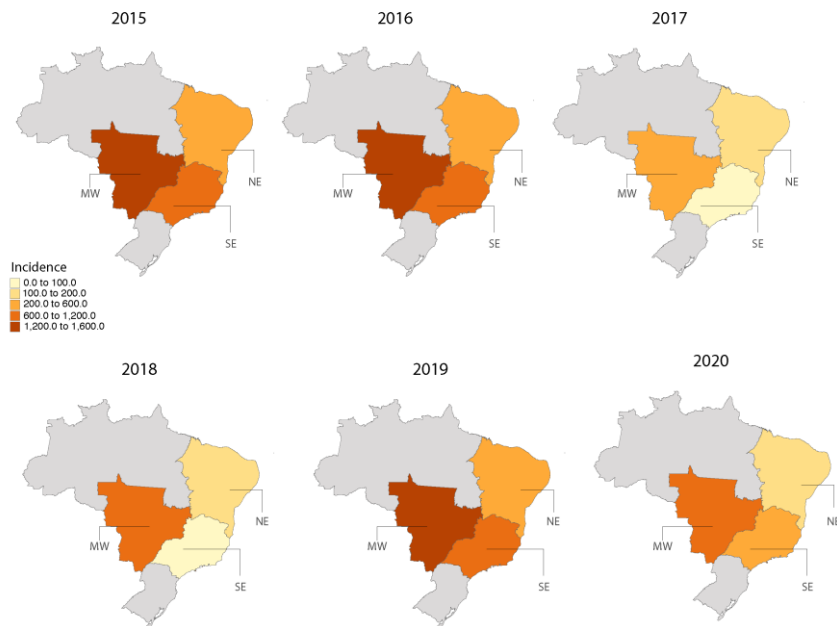
APÊNDICE A - Material suplementar do artigo “*Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil*”

## Supplementary Figure 1



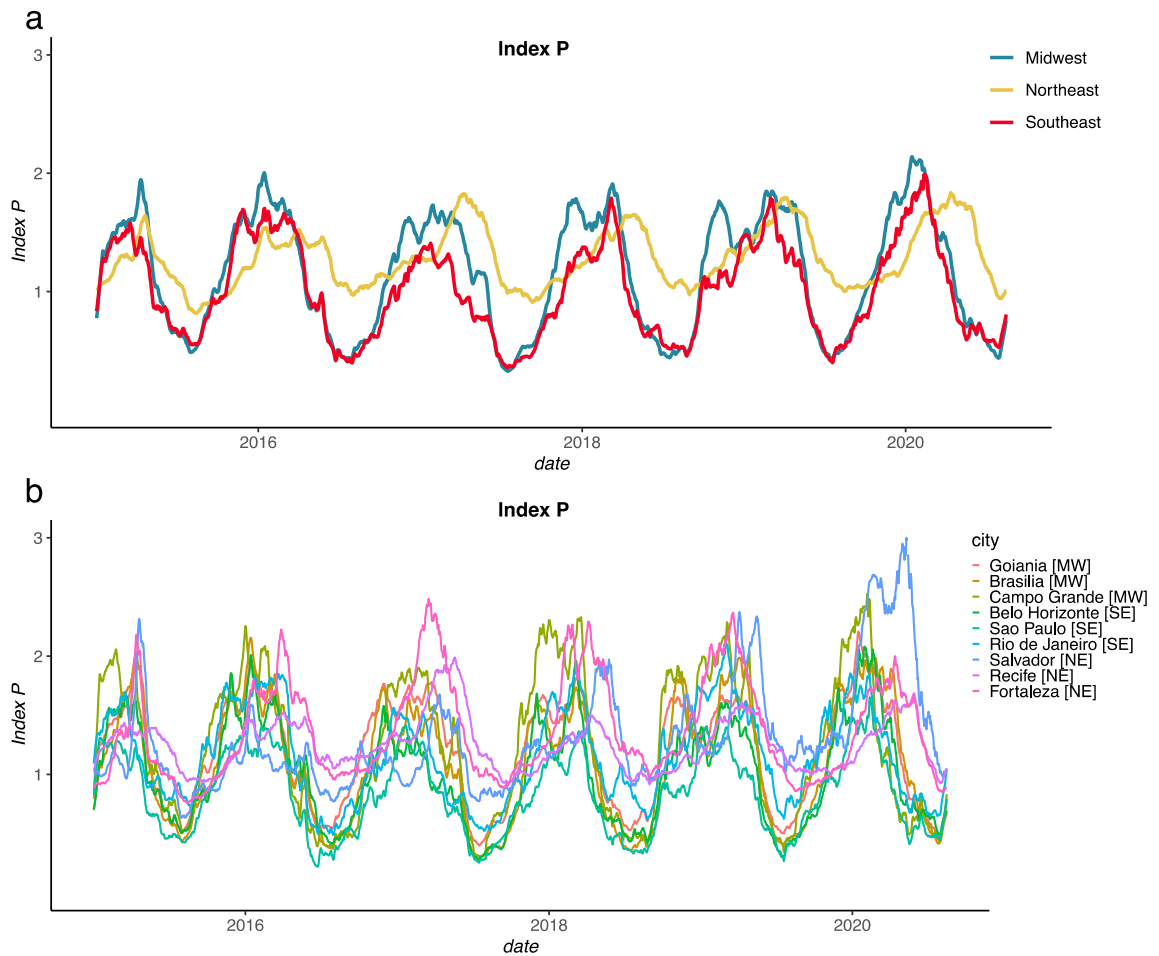
**Figure S1. Patterns of serotype dominance 2015-2020.** Map of Brazil showing the progression of serotypes in the three geographic regions sampled in this study - Midwest (MW), Northeast (NE), and Southeast (SE) - between 2015 and 2020 (until EW06). Brazilian macro regions are coloured according to the dominant serotype. Grey represents northern and southern Brazilian macro regions. The initial map of Brazilian regions was obtained from the R package “get\_brmap” (available at: [https://rdr.io/cran/brazilmaps/man/get\\_brmap.html](https://rdr.io/cran/brazilmaps/man/get_brmap.html)). Source data are provided as a Source Data file.

## Supplementary Figure 2



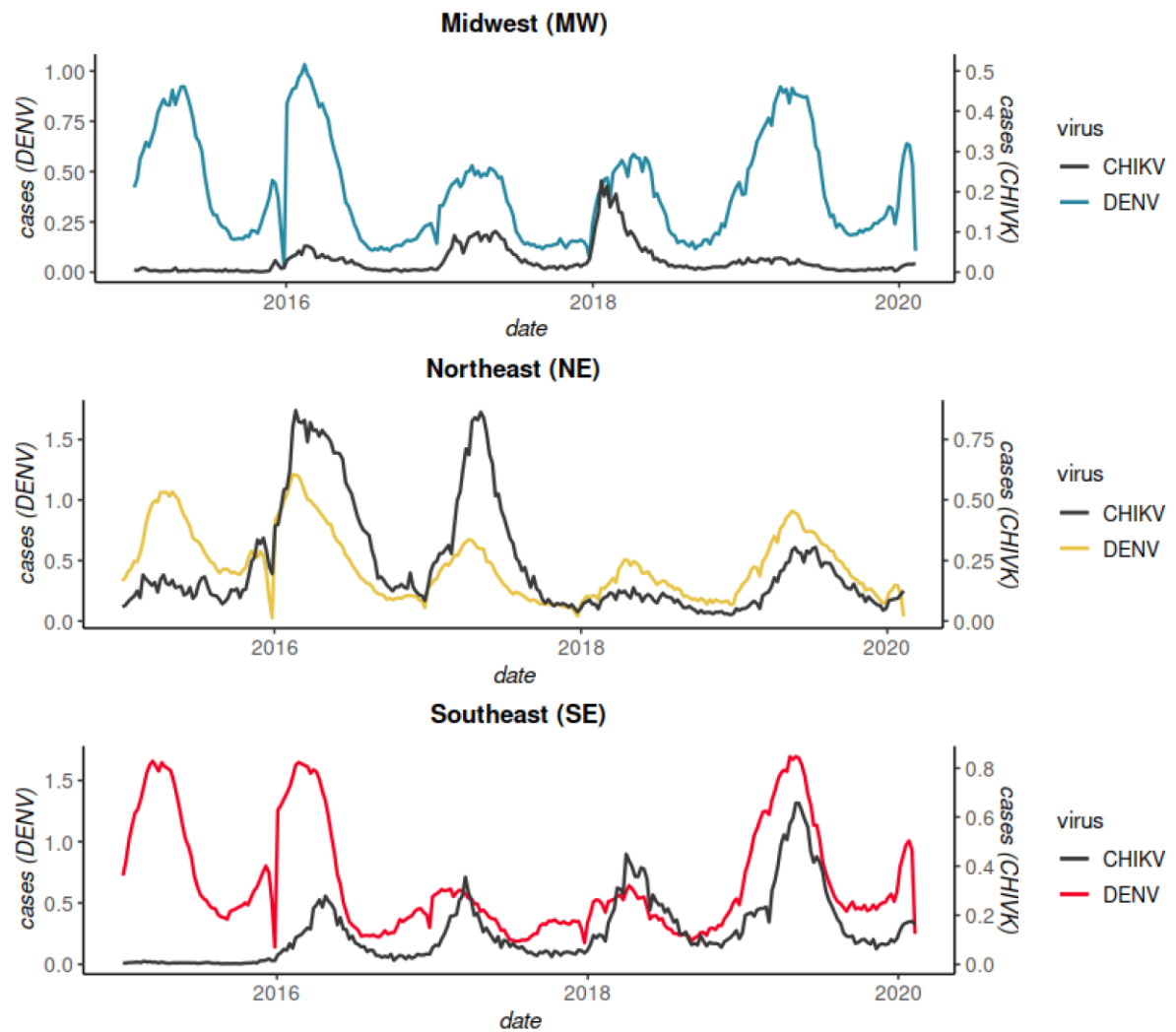
**Figure S2. Maps of yearly incidence of dengue in Brazil, 2015-2020.** Maps of Brazil divided by regions (SE=Southeast, NE=Northeast, MW=Midwest) showing the yearly incidence of dengue between 2015 and 2020 (until EW06). Incidence = cases per 100,000 inhabitants per year. Grey represents northern and southern Brazilian macro regions. The initial map of Brazilian regions was obtained from the R package “get\_brmap” (available at: [https://rdr.io/cran/brazilmaps/man/get\\_brmap.html](https://rdr.io/cran/brazilmaps/man/get_brmap.html)).

## Supplementary Figure 3



**Figure S3. Mosquito-borne viral suitability measure (index P).** **a.** Daily mosquito-viral suitability measure (index P) for each of the macro regions from which new genomes were generated. The index P is obtained by averaging the climatic time series of the three largest urban centers in each region and then independently estimating index P. These series are presented in Figure 1 of the main text. **b.** Daily mosquito-viral suitability measure (index P) for the three cities per macro region used for panel a and for the main text. Cities are named in the color legend and tagged with their macro region. **(a-b)** The entomological and epidemiological priors used to estimate P are the (dengue) default for the MVSE R-package<sup>49</sup> (see Supplementary File 1). Source data are provided as a Source Data file.

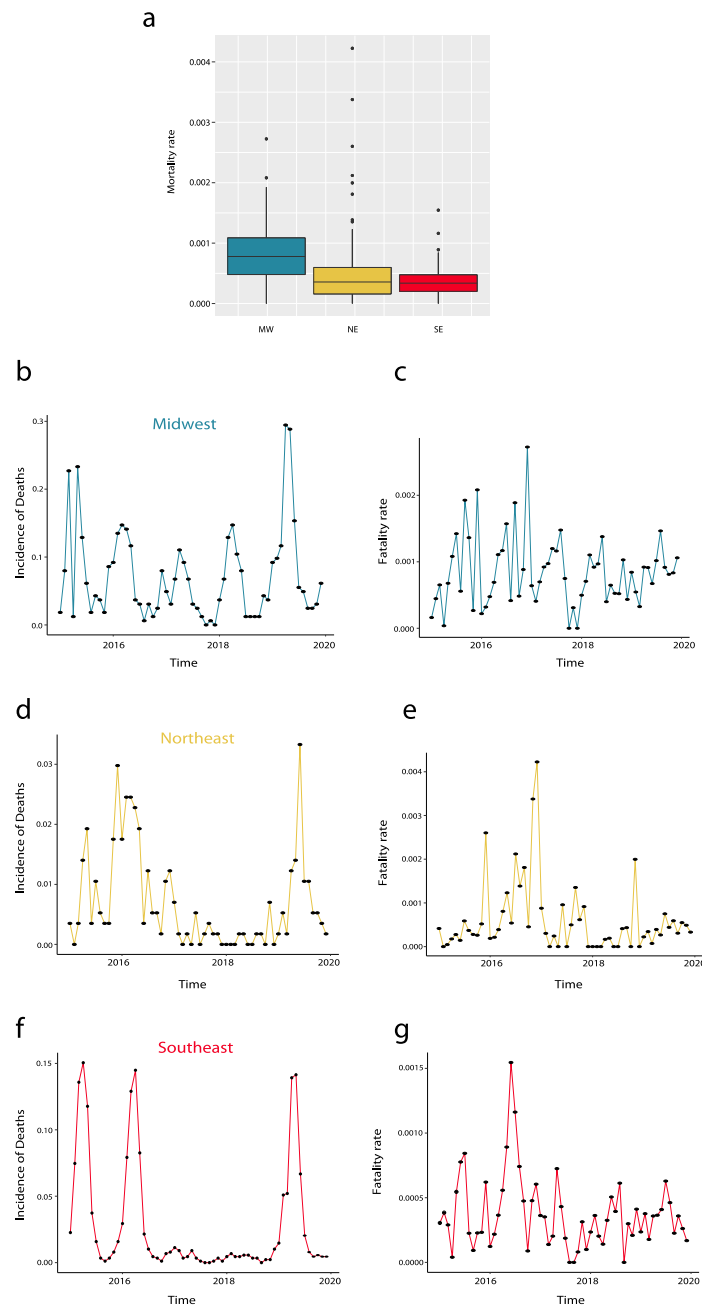
## Supplementary Figure 4



**Figure S4. Weekly notified dengue cases normalized per 100K individuals per region in 2015-2020 (until EW06).** DENV epidemic curves are coloured according to geographical macro region: SE=Southeast, NE=Northeast, MW=Midwest. CHIKV epidemic curves are coloured in black for each of the macro regions. Incidence (cases per 100K population) is presented in log<sub>10</sub> for visual purposes. Source data are provided as a Source Data file.

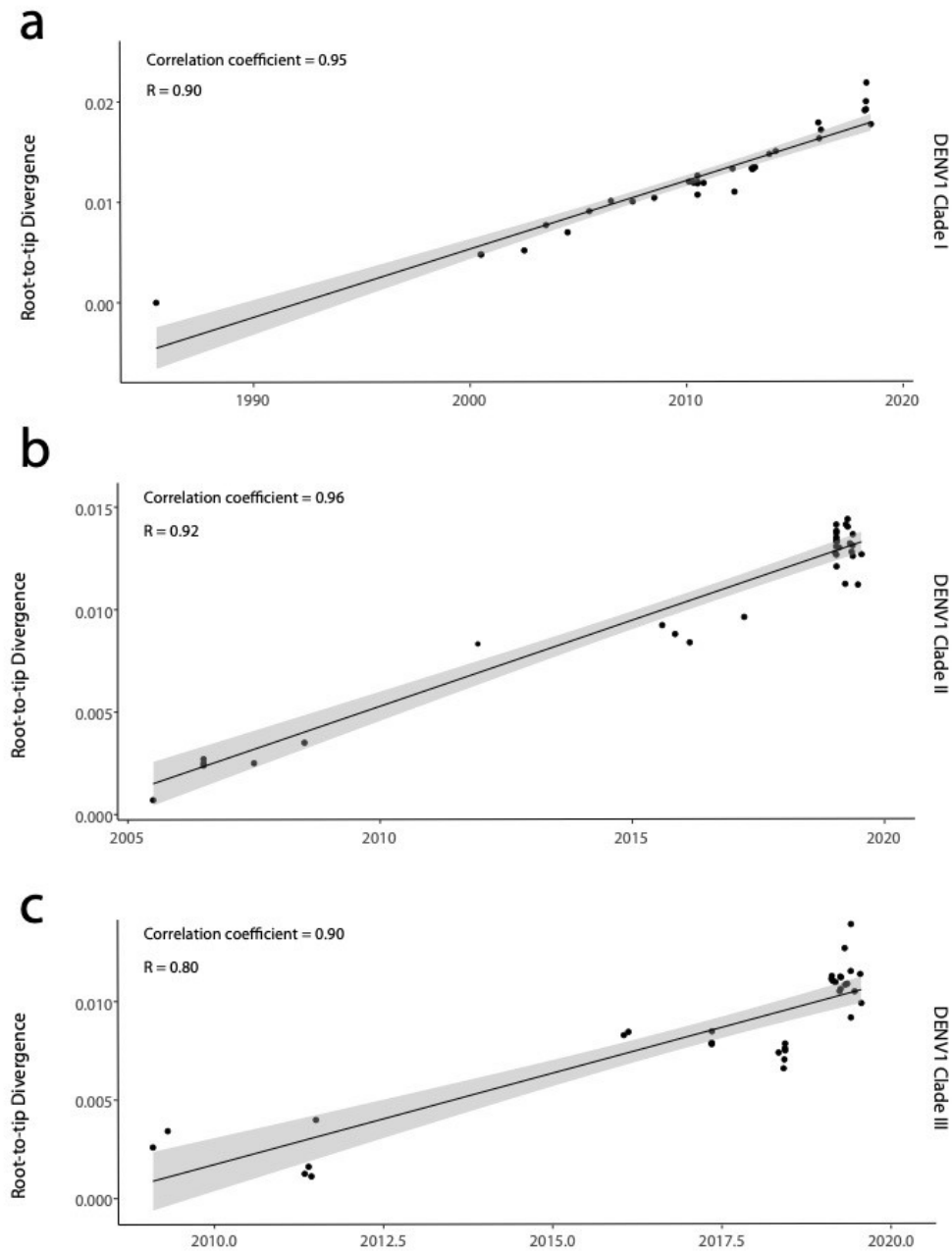


## Supplementary Figure 5



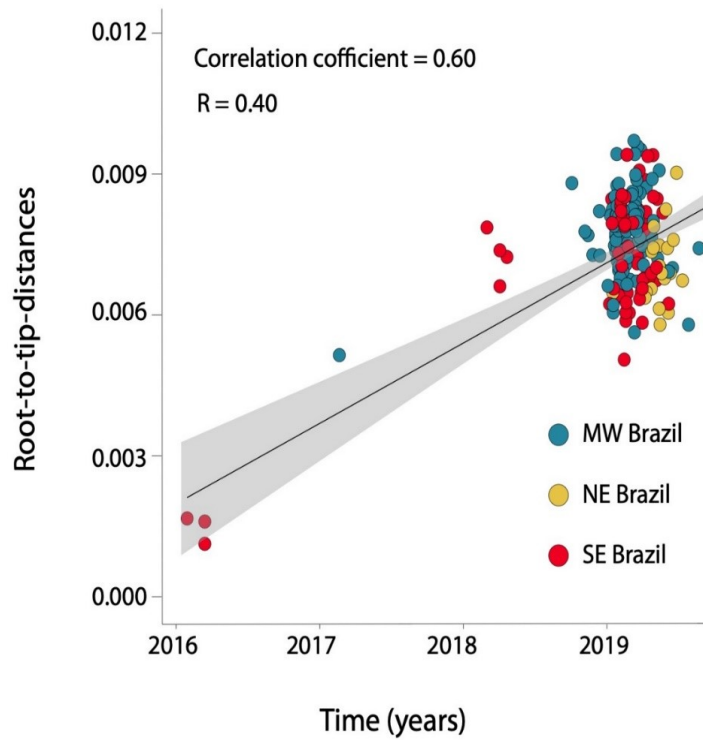
**Figure S5. DENV mortality in Brazil, 2015-2019.** **a.** Boxplot of the case fatality rate (deaths/cases) of dengue in the three Brazilian regions sampled in this study, 2015-2019. Boxplots are coloured according to Brazilian geographical region, Midwest (MW)  $n=8$ , Northeast (NE)  $n=11$ , and Southeast (SE)  $n=20$ . Boxplots show interquartile ranges, white lines are medians and box whiskers show the full range of posterior distribution. **b-c.** Time series of the incidence of deaths (number of fatal dengue /number of cases) reported weekly (c) and case fatality rate (number of fatal dengue /number of cases per 100K population) (d) in MW. **d-e.** Same as b and c but for NE. **f-g.** Same as b and c but for SE. Dates with no deaths reported were assumed to be reflective of no deaths, although it is possible that some instances of no deaths reflect a lack of reporting. Source data are provided as a Source Data file.

## Supplementary Figure 6



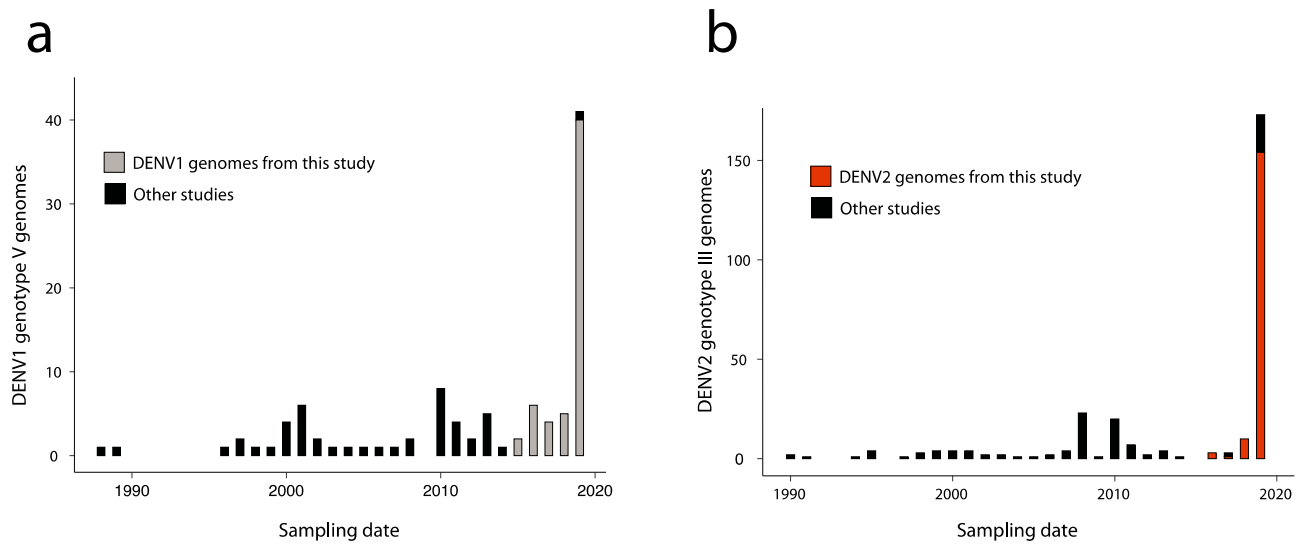
**Figure S6. Analysis of temporal structure in DENV1 genotype V clades I-III.** **a.** Root-to-tip genetic divergence of Clade I against time of sampling ( $n=33$ ) **b.** Root-to-tip genetic divergence for Clade II against time of sampling ( $n=34$ ). **c.** Root-to-tip genetic divergence for Clade III against time of sampling ( $n=34$ ). Black lines represent the medium values of the linear regression despite the grey ones represent the interval among the minimum and maximum values.

## Supplementary Figure 7



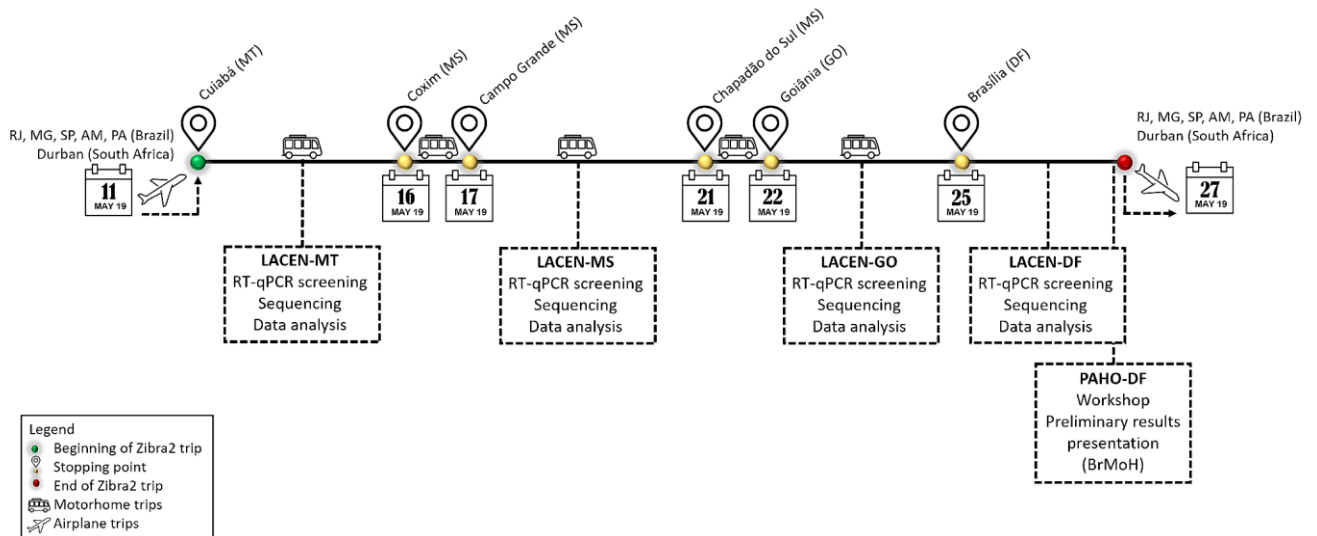
**Figure S7. Genetic divergence regressed against date of sample collection for the BR-4 clade of DENV2 ( $n=181$ ).** MW=Brazilian Midwest, NE Brazil=Brazilian Northeast, SE Brazil=Brazilian Southeast. Black lines represent the medium values of the linear regression despite the grey ones represent the interval among the minimum and maximum values.

## Supplementary Figure 8



**Figure S8. Number of complete DENV1 and DENV2 genomes sequences from Brazil, 1988-2020.** **a.** Comparative bar chart of the number of DENV1 genotype V complete genomes sequences generated in Brazil between 1988 and 2020 and available in public databases until May 2020. Gray bars represent the genomes from this study, while black bars indicate the genomes from previous studies. **b.** Comparative bar chart of the number of DENV2 genotype III complete genomes sequences generated in Brazil between 1990 and 2020 and available in public databases until May 2020. Red bars represent the genomes from this study, while black bars indicate the genomes from previous studies. Source data are provided as a Source Data file.

## Supplementary Figure 9



**Figure S9. Timeline of the ZIBRA2 itinerant project across the Brazilian Midwest region.** Researchers from Brazil (RJ=Rio de Janeiro, MG=Minas Gerais, SP=São Paulo, AM=Amazonas, and PA=Pará) and from Durban (South Africa) visited the public health laboratories (LACEN) in the Brazilian Midwest region (showed above the line) on board a mobile laboratory (motorhome) to carry out the field genomic surveillance activities (showed below the line). The event ended in a workshop held at PAHO/WHO to present the preliminary results to the health authorities. MT=Mato Grosso, MS=Mato Grosso do Sul, GO=Goiás, DF=Brazilian Federal District. The Bus and Airplane icons were created by Mariagloria Posani and Kiddo, respectively, and are currently available at the Noun Project (<https://thenounproject.com/>).

**Supplementary Table 1. Number of molecularly confirmed DENV cases in the three Brazilian macro regions, 2015-2020.**

REGION	SEROTYPE	YEAR					
		2015	2016	2017	2018	2019	2020*
MW	DENV1	2467	970	55	16	27	40
	DENV2	28	19	231	520	2361	2184
	DENV3	2	2	1	0	0	20
	DENV4	219	64	23	1	2	0
NE	DENV1	387	66	15	245	1398	68
	DENV2	15	7	3	38	456	36
	DENV3	37	17	0	0	0	0
	DENV4	44	0	0	1	0	0
SE	DENV1	2145	1703	48	132	274	173
	DENV2	15	81	19	333	3068	1086
	DENV3	0	7	10	1	5	2
	DENV4	72	13	1	0	3	0

MW=Midwest region; NE=Northeast region; SE=Southeast region

\* Until EW06

**Supplementary Table 2. Information on the 227 sequenced samples of DENV1 and DENV2.**

ID	Serotype	Sample	Collection date	Date onset symptoms	Sex	Age	Municipality	State	Ct	DENV Classification
OPAS 41	DENV1	Serum	16/01/2019	16/01/2019	F	77	Feira de Santana	BA	17	Dengue with no alarm sign
OPAS 42	DENV1	Serum	17/01/2019	17/01/2019	M	25	Feira de Santana	BA	17	Dengue with no alarm sign
OPAS 43	DENV1	Serum	17/01/2019	17/01/2019	F	59	Feira de Santana	BA	22	Dengue with no alarm sign
OPAS 44	DENV1	Serum	18/01/2019	18/01/2019	F	30	Feira de Santana	BA	24	Dengue with no alarm sign
OPAS 45	DENV1	Serum	17/01/2019	17/01/2019	F	4	Feira de Santana	BA	26	Dengue with no alarm sign
OPAS 46	DENV1	Serum	17/01/2019	17/01/2019	F	8	Feira de Santana	BA	23	Dengue with no alarm sign
OPAS 47	DENV1	Serum	18/01/2019	17/01/2019	F	13	Feira de Santana	BA	26	Dengue with no alarm sign
OPAS 48	DENV1	Serum	17/01/2019	17/01/2019	M	20	Feira de Santana	BA	20	Dengue with no alarm sign
OPAS 49	DENV1	Serum	21/01/2019	21/01/2019	F	14	Feira de Santana	BA	20	Dengue with no alarm sign
OPAS 50	DENV1	Serum	15/01/2019	15/01/2019	F	21	Feira de Santana	BA	22	Dengue with no alarm sign
OPAS 56	DENV1	Serum	16/05/2019	16/05/2019	F	11	Coração de Maria	BA	27	Dengue with no alarm sign
OPAS 57	DENV1	Serum	08/04/2019	07/04/2019	F	19	Barreiras	BA	20	Dengue with no alarm sign
OPAS 58	DENV1	Serum	25/04/2019	20/04/2019	M	15	Feira de Santana	BA	26	Dengue with no alarm sign
OPAS 60	DENV1	Serum	09/01/2019	07/01/2019	M	31	Feira de Santana	BA	21	Dengue with no alarm sign
OPAS 61	DENV1	Serum	06/02/2019	06/02/2019	M	35	Coração de Maria	BA	16	Dengue with no alarm sign
OPAS 62	DENV1	Serum	07/05/2019	04/05/2019	F	28	Coração de Maria	BA	26	Dengue with no alarm sign
OPAS 63	DENV1	Serum	16/05/2019	12/05/2019	F	27	Coração de Maria	BA	19	Dengue with no alarm sign
OPAS 64	DENV1	Serum	27/03/2019	21/03/2019	M	50	Coração de Maria	BA	23	Dengue with no alarm sign
OPAS 65	DENV1	Serum	14/05/2019	10/05/2019	F	13	Coração de Maria	BA	26	Dengue with no alarm sign
OPAS 157	DENV1	Serum	05/04/2019	NA	F	34	Brasília	DF	16	Severe dengue
OPAS 158	DENV1	Serum	18/07/2019	NA	F	29	Brasília	DF	19	Severe dengue
GO03	DENV1	Serum	06/11/2015	02/11/2015	F	41	Aparecida de Goiânia	GO	NA	Dengue with no alarm sign
GO04	DENV1	Serum	05/08/2015	01/08/2015	F	21	Goiânia	GO	NA	Dengue with no alarm sign
OPAS 131	DENV1	Serum	07/03/2019	06/03/2019	F	25	Valparaíso	GO	17	Dengue with no alarm sign
OPAS 132	DENV1	Serum	03/04/2019	30/03/2019	F	62	Novo Gama	GO	30	Dengue with no alarm sign
OPAS 133	DENV1	Serum	02/04/2019	29/03/2019	F	65	Valparaíso	GO	24	Dengue with no alarm sign
OPAS 134	DENV1	Serum	09/04/2019	08/04/2019	F	26	Goiânia	GO	20	Dengue with no alarm sign
OPAS 135	DENV1	Serum	13/02/2019	08/02/2019	F	47	Rio Verde	GO	28	Dengue with



										no alarm sign
<b>OPAS 136</b>	DENV1	Serum	15/02/2019	11/02/2019	F	49	Caldas Novas	GO	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 137</b>	DENV1	Serum	21/02/2019	16/02/2019	F	14	Rio Verde	GO	22	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 138</b>	DENV1	Serum	29/03/2019	28/03/2019	M	21	Valparaíso	GO	27	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 90</b>	DENV1	Serum	13/02/2016	11/02/2016	F	49	Conselheiro Lafaiete	MG	16	Death
<b>OPAS 92</b>	DENV1	Serum	14/03/2016	09/03/2016	M	67	Juiz de Fora	MG	19	Death
<b>OPAS 99</b>	DENV1	Serum	19/04/2018	16/04/2018	F	33	Montes Claros	MG	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 100</b>	DENV1	Serum	12/04/2018	10/04/2018	F	30	Janaúba	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 101</b>	DENV1	Serum	12/04/2018	09/04/2018	F	43	Janaúba	MG	23	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 102</b>	DENV1	Serum	22/03/2018	19/03/2018	F	35	Belo Horizonte	MG	15	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 103</b>	DENV1	Serum	05/07/2018	02/07/2018	F	32	Coração de Jesus	MG	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 165</b>	DENV1	Serum	21/03/2017	18/03/2017	M	35	Brasília de Minas	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 167</b>	DENV1	Serum	09/05/2017	07/05/2017	M	19	São Francisco	MG	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 168</b>	DENV1	Serum	08/05/2017	05/05/2017	M	53	Varzelândia	MG	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 169</b>	DENV1	Serum	08/05/2017	05/05/2017	F	72	Varzelândia	MG	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 148</b>	DENV1	Liver	28/04/2019	24/04/2019	F	12	Recife	PE	25	Death
<b>OPAS 149</b>	DENV1	Liver	29/05/2019	12/05/2019	F	30	Cabo de Santo Agostino	PE	29	Death
<b>OPAS 150</b>	DENV1	Liver	28/05/2019	21/05/2019	F	36	Buíque	PE	25	Death
<b>OPAS 151</b>	DENV1	Spleen	18/06/2019	10/06/2019	M	15	Ipojuca	PE	29	Death
<b>OPAS 152</b>	DENV1	Liver	22/06/2019	19/06/2019	M	78	Sertânia	PE	26	Death
<b>OPAS 153</b>	DENV1	Spleen	18/07/2019	14/07/2019	M	5	Recife	PE	24	Death
<b>OPAS 154</b>	DENV1	Liver	24/07/2019	18/07/2019	M	14	Carpina	PE	24	Death
<b>OPAS 155</b>	DENV1	Serum	09/05/2019	09/05/2019	M	14	Custódia	PE	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 156</b>	DENV1	Serum	29/05/2019	26/05/2019	F	18	Jaboatão dos Guararapes	PE	17	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 162</b>	DENV1	Spleen	22/03/2019	16/03/2019	M	29	Bom Conselho	PE	24	Death
<b>OPAS 163</b>	DENV1	Spleen	25/04/2019	20/04/2019	M	6	Timbaúba	PE	24	Death
<b>OPAS 171</b>	DENV1	Serum	19/01/2016	25/01/2016	M	29	Ribeirão Preto	SP	35	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 173</b>	DENV1	Serum	29/01/2016	01/02/2016	F	42	Ribeirão Preto	SP	22	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 174</b>	DENV1	Serum	13/02/2016	17/02/2016	F	23	Ribeirão Preto	SP	33	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 175</b>	DENV1	Serum	20/02/2016	23/02/2016	F	28	Ribeirão Preto	SP	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 51</b>	DENV2	Serum	25/04/2019	21/04/2019	M	54	Barreiras	BA	25	Death
<b>OPAS 52</b>	DENV2	Serum	29/04/2019	28/04/2019	F	16	Barreiras	BA	28	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 53</b>	DENV2	Serum	07/06/2019	05/06/2019	F	36	Feira de Santana	BA	24	Dengue with no alarm sign

<b>OPAS 54</b>	DENV2	Serum	16/01/2019	12/01/2019	F	11	Irece	BA	24	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 55</b>	DENV2	Serum	11/04/2019	08/04/2019	F	38	Barreiras	BA	26	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 110</b>	DENV2	Serum	14/05/2019	13/05/2019	M	20	Barreiras	BA	25	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 111</b>	DENV2	Serum	19/06/2019	16/06/2019	M	35	Juazeiro	BA	21	Severe dengue
<b>OPAS 112</b>	DENV2	Serum	11/06/2019	10/06/2019	F	16	Presidente Dutra	BA	29	Death
<b>OPAS 113</b>	DENV2	Serum	06/06/2019	03/06/2019	F	6	Feira de Santana	BA	26	Severe dengue
<b>OPAS 114</b>	DENV2	Serum	12/07/2019	12/07/2019	F	61	Salvador	BA	27	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 115</b>	DENV2	Serum	04/06/2019	01/06/2019	F	43	Salvador	BA	27	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 116</b>	DENV2	Serum	30/04/2019	26/04/2019	F	15	Barreiras	BA	28	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 117</b>	DENV2	Serum	24/04/2019	20/04/2019	M	34	Barreiras	BA	25	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 118</b>	DENV2	Serum	08/04/2019	06/04/2019	F	39	Barreiras	BA	25	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 119</b>	DENV2	Serum	16/05/2019	14/05/2019	F	20	Barreiras	BA	26	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 120</b>	DENV2	Serum	27/05/2019	24/05/2019	F	63	Barreiras	BA	22	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 121</b>	DENV2	Serum	14/05/2019	12/05/2019	M	24	Barreiras	BA	29	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 122</b>	DENV2	Serum	21/05/2019	19/05/2019	F	12	Barreiras	BA	29	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 123</b>	DENV2	Serum	20/05/2019	18/05/2019	F	21	Barreiras	BA	22	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 124</b>	DENV2	Serum	14/05/2019	10/05/2019	F	24	Barreiras	BA	28	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 161</b>	DENV2	Serum	23/08/2019	NA	M	44	Brasília	DF	21	Severe dengue
<b>GO72</b>	DENV2	Liver	25/04/2019	12/04/2019	M	53	Goiania	GO	25	Death
<b>GO75</b>	DENV2	Serum	29/04/2019	28/04/2019	F	28	Goiania	GO	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 66</b>	DENV2	Serum	17/01/2019	16/01/2019	F	40	Luziânia	GO	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 67</b>	DENV2	Serum	17/01/2019	15/01/2019	M	44	Caldas Novas	GO	16	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 68</b>	DENV2	Serum	18/01/2019	14/01/2019	M	61	Firminópolis	GO	22	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 69</b>	DENV2	Serum	24/01/2019	22/01/2019	M	29	Caldas Novas	GO	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 70</b>	DENV2	Serum	28/01/2019	25/01/2019	F	39	Caldas Novas	GO	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 71</b>	DENV2	Serum	01/02/2019	29/01/2019	M	24	Goiânia	GO	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 72</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	28/01/2019	F	79	São Luís de Montes Belos	GO	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 74</b>	DENV2	Serum	04/02/2019	02/02/2019	F	23	Caldas Novas	GO	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 75</b>	DENV2	Serum	07/02/2019	06/02/2019	F	20	Goiânia	GO	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 76</b>	DENV2	Serum	11/02/2019	08/02/2019	M	64	Firminópolis	GO	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 77</b>	DENV2	Serum	11/02/2019	09/02/2019	M	35	Turvânia	GO	16	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 78</b>	DENV2	Serum	11/02/2019	08/02/2019	M	60	Rio Verde	GO	17	Dengue with no alarm sign

<b>OPAS 79</b>	DENV2	Serum	21/02/2019	18/02/2019	M	84	Goiânia	GO	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 80</b>	DENV2	Serum	22/02/2019	20/02/2019	F	18	Corumbá	GO	16	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 81</b>	DENV2	Serum	18/02/2019	16/02/2019	F	41	Rio Verde	GO	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 82</b>	DENV2	Serum	01/03/2019	27/02/2019	F	29	Goiânia	GO	17	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 83</b>	DENV2	Serum	12/03/2019	11/03/2019	M	42	Caldas Novas	GO	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 84</b>	DENV2	Serum	18/03/2019	16/03/2019	F	36	Paraúna	GO	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 85</b>	DENV2	Serum	26/03/2019	22/03/2019	F	79	Goiatuba	GO	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 86</b>	DENV2	Serum	04/04/2019	31/03/2019	M	22	Goiânia	GO	24	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 87</b>	DENV2	Serum	27/03/2019	26/03/2019	M	30	Israelândia	GO	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 89</b>	DENV2	Serum	27/03/2019	24/03/2019	M	40	Israelândia	GO	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 125</b>	DENV2	Liver	20/02/2017	16/02/2017	M	47	Goiânia	GO	23	Death
<b>OPAS 126</b>	DENV2	Spleen	06/11/2018	01/11/2018	F	47	Rio Verde	GO	22	Death
<b>OPAS 127</b>	DENV2	Liver	06/02/2019	03/02/2019	F	63	Turvânia	GO	25	Death
<b>OPAS 128</b>	DENV2	Liver	23/02/2019	19/02/2019	M	36	Anápolis	GO	22	Death
<b>OPAS 129</b>	DENV2	Serum	10/05/2019	04/05/2019	F	76	Goiânia	GO	20	Death
<b>OPAS 130</b>	DENV2	Spleen	17/06/2019	13/06/2019	M	25	Goianira	GO	19	Death
<b>OPAS 139</b>	DENV2	Serum	28/02/2008	25/02/2008	F	34	Goiânia	GO	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 140</b>	DENV2	Serum	04/03/2008	02/03/2008	F	38	Aparecida de Goiânia	GO	26	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 142</b>	DENV2	Serum	11/03/2008	09/03/2008	M	23	Aparecida de Goiânia	GO	16	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 159</b>	DENV2	Serum	14/05/2019	NA	M	43	Valparaíso	GO	25	Severe dengue
<b>OPAS 01</b>	DENV2	Serum	07/02/2019	07/02/2019	M	77	Betim	MG	28	Death
<b>OPAS 02</b>	DENV2	Serum	18/03/2019	15/03/2019	M	80	Uberaba	MG	35	Death
<b>OPAS 03</b>	DENV2	Serum	27/03/2019	25/03/2019	M	90	Uberlandia	MG	25	Death
<b>OPAS 04</b>	DENV2	Serum	14/01/2019	12/01/2019	F	53	Uberaba	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 05</b>	DENV2	Serum	10/04/2019	07/04/2019	M	49	Jaboticatubas	MG	23	Death
<b>OPAS 06</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	30/01/2019	M	46	Unai	MG	23	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 07</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	29/01/2019	M	59	Unai	MG	23	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 08</b>	DENV2	Serum	09/05/2019	08/05/2019	F	54	Ribeirao das Neves	MG	22	Death
<b>OPAS 09</b>	DENV2	Serum	19/02/2019	18/02/2019	M	39	Uberaba	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 10</b>	DENV2	Serum	01/02/2019	29/01/2019	M	55	Patrocínio	MG	26	Death
<b>OPAS 11</b>	DENV2	Serum	25/05/2019	21/05/2019	M	35	Ribeirao das Neves	MG	25	Death
<b>OPAS 12</b>	DENV2	Serum	23/05/2019	23/05/2019	M	6	Patos de Minas	MG	27	Death
<b>OPAS 13</b>	DENV2	Serum	12/02/2019	09/02/2019	F	39	Arinos	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 14</b>	DENV2	Serum	18/02/2019	16/02/2019	M	61	Prata	MG	20	Dengue with

										no alarm sign
<b>OPAS 15</b>	DENV2	Serum	18/02/2019	17/02/2019	F	24	Prata	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 16</b>	DENV2	Serum	05/02/2019	03/02/2019	F	54	Capinópolis	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 17</b>	DENV2	Serum	14/02/2019	12/02/2019	M	79	Ipiacu	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 18</b>	DENV2	Serum	24/02/2019	22/02/2019	M	19	Curvelo	MG	35	Death
<b>OPAS 19</b>	DENV2	Serum	26/02/2019	23/02/2019	M	50	Uberaba	MG	16	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 20</b>	DENV2	Serum	27/02/2019	24/02/2019	F	52	Uberaba	MG	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 21</b>	DENV2	Serum	22/02/2019	20/02/2019	F	44	Januaria	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 22</b>	DENV2	Serum	19/03/2019	18/03/2019	F	16	Uberlandia	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 23</b>	DENV2	Serum	19/03/2019	18/03/2019	F	20	Uberlandia	MG	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 24</b>	DENV2	Spleen	28/03/2019	28/03/2019	F	47	Ibia	MG	34	Death
<b>OPAS 25</b>	DENV2	Serum	25/03/2019	23/03/2019	M	43	Uberaba	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 26</b>	DENV2	Serum	21/03/2019	20/03/2019	F	20	Uberaba	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 27</b>	DENV2	Serum	01/04/2019	31/03/2019	F	6	Belo Horizonte	MG	32	Death
<b>OPAS 28</b>	DENV2	Serum	29/03/2019	26/03/2019	F	60	Patrocínio	MG	19	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 29</b>	DENV2	Serum	02/04/2019	30/03/2019	M	46	Buritis	MG	18	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 30</b>	DENV2	Serum	01/04/2019	31/03/2019	F	38	Natalândia	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 31</b>	DENV2	Serum	08/03/2019	03/04/2019	M	67	Passos	MG	34	Death
<b>OPAS 32</b>	DENV2	Serum	12/04/2019	11/14/2019	M	60	Ituiutaba	MG	17	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 33</b>	DENV2	Serum	12/04/2019	09/04/2019	F	68	Araguari	MG	20	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 34</b>	DENV2	Serum	12/04/2019	10/04/2019	M	77	Ituiutaba	MG	17	Death
<b>OPAS 35</b>	DENV2	Serum	24/04/2019	20/04/2019	F	65	Campos Gerais	MG	35	Death
<b>OPAS 36</b>	DENV2	Plasma	07/05/2019	04/05/2019	F	55	Contagem	MG	34	Death
<b>OPAS 37</b>	DENV2	Serum	07/05/2019	05/05/2019	M	26	Ituiutaba	MG	22	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 38</b>	DENV2	Serum	07/06/2019	04/06/2019	M	26	Montes Claros	MG	25	Death
<b>OPAS 39</b>	DENV2	Serum	06/04/2019	03/04/2019	F	59	Belo Horizonte	MG	25	Death
<b>OPAS 40</b>	DENV2	Serum	17/04/2019	12/04/2019	M	11	Belo Horizonte	MG	35	Death
<b>OPAS 93</b>	DENV2	Serum	29/01/2016	28/01/2016	F	31	Uberaba	MG	25	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 95</b>	DENV2	Serum	14/03/2016	12/03/2016	F	35	Uberaba	MG	23	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 96</b>	DENV2	Serum	14/03/2016	12/03/2016	M	59	Uberaba	MG	26	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 105</b>	DENV2	Serum	22/04/2018	16/04/2018	F	54	Ituiutaba	MG	21	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 106</b>	DENV2	Serum	04/04/2018	02/04/2018	F	24	Capinópolis	MG	25	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 107</b>	DENV2	Serum	04/04/2018	03/04/2018	F	39	Capinópolis	MG	19	Dengue with no alarm sign

<b>OPAS 108</b>	DENV2	Serum	02/03/2018	27/02/2018	F	31	Ituiutaba	MG	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG02</b>	DENV2	Serum	21/01/2019	20/01/2019	M	40	Campo Grande	MS	24	Dengue with no alarm sign
<b>CG06</b>	DENV2	Serum	22/03/2019	20/03/2019	F	46	Campo Grande	MS	21	Dengue with no alarm sign
<b>CG07</b>	DENV2	Serum	22/03/2019	21/03/2019	M	12	Campo Grande	MS	20	Dengue with no alarm sign
<b>CG08</b>	DENV2	Serum	26/02/2019	23/02/2019	F	31	Jaraguari	MS	31	Dengue with no alarm sign
<b>CG09</b>	DENV2	Serum	20/02/2019	18/02/2019	F	4	Camapuã	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG10</b>	DENV2	Serum	07/03/2019	03/03/2019	F	24	Jaraguari	MS	27	Dengue with no alarm sign
<b>CG11</b>	DENV2	Serum	14/12/2018	12/12/2018	M	38	Campo Grande	MS	24	Dengue with no alarm sign
<b>CG12</b>	DENV2	Serum	04/10/2018	01/10/2018	M	39	Campo Grande	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG13</b>	DENV2	Serum	14/11/2018	13/11/2018	F	26	Campo Grande	MS	22	Dengue with no alarm sign
<b>CG14</b>	DENV2	Serum	26/11/2018	23/11/2018	F	27	Campo Grande	MS	21	Dengue with no alarm sign
<b>CG15</b>	DENV2	Serum	13/12/2018	11/12/2018	F	31	Campo Grande	MS	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG16</b>	DENV2	Serum	26/01/2019	25/01/2019	M	41	Campo Grande	MS	18	Dengue with no alarm sign
<b>CG17</b>	DENV2	Serum	24/01/2019	22/01/2019	M	23	Campo Grande	MS	19	Dengue with no alarm sign
<b>CG18</b>	DENV2	Serum	22/03/2019	21/03/2019	F	20	Corumbá	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG19</b>	DENV2	Serum	07/03/2019	06/03/2019	F	13	Dois Irmãos do Buriti	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG20</b>	DENV2	Serum	13/03/2019	11/03/2019	F	9	Douradina	MS	32	Dengue with no alarm sign
<b>CG21</b>	DENV2	Serum	14/03/2019	14/03/2019	F	63	Nioaque	MS	22	Dengue with no alarm sign
<b>CG22</b>	DENV2	Serum	17/03/2019	15/03/2019	M	24	Mundo Novo	MS	30	Dengue with no alarm sign
<b>CG23</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	29/01/2019	M	56	Campo Grande	MS	17	Dengue with no alarm sign
<b>CG24</b>	DENV2	Serum	19/03/2019	16/03/2019	M	69	Aparecida do Taboado	MS	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG68</b>	DENV2	Serum	25/01/2019	22/01/2019	F	19	Campo Grande	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG69</b>	DENV2	Serum	23/01/2019	21/01/2019	F	46	Campo Grande	MS	24	Dengue with no alarm sign
<b>CG70</b>	DENV2	Serum	26/01/2019	24/01/2019	M	49	Campo Grande	MS	27	Dengue with no alarm sign
<b>CG71</b>	DENV2	Serum	02/02/2019	31/01/2019	M	42	Campo Grande	MS	17	Dengue with no alarm sign
<b>CG81</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	24/01/2019	F	21	Campo Grande	MS	22	Dengue with no alarm sign
<b>CG86</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	30/01/2019	M	11	Campo Grande	MS	17	Dengue with no alarm sign
<b>CG87</b>	DENV2	Serum	25/01/2019	23/01/2019	M	14	Campo Grande	MS	22	Dengue with no alarm sign
<b>CG90</b>	DENV2	Serum	23/01/2019	23/01/2019	M	15	Campo Grande	MS	16	Dengue with no alarm sign
<b>CG94</b>	DENV2	Serum	21/01/2019	17/01/2019	F	54	Campo Grande	MS	29	Dengue with no alarm sign
<b>CG96</b>	DENV2	Serum	20/01/2019	18/01/2019	F	41	Campo Grande	MS	16	Dengue with no alarm sign
<b>CG99</b>	DENV2	Serum	06/03/2019	05/03/2019	M	37	Campo Grande	MS	29	Dengue with no alarm sign

<b>CG100</b>	DENV2	Serum	17/03/2019	16/03/2019	F	19	Chapadão Do Sul	MS	20	Dengue with no alarm sign
<b>CG102</b>	DENV2	Serum	27/01/2019	26/01/2019	M	28	Campo Grande	MS	20	Dengue with no alarm sign
<b>CG103</b>	DENV2	Serum	26/01/2019	25/01/2019	M	32	Campo Grande	MS	22	Dengue with no alarm sign
<b>CG104</b>	DENV2	Serum	23/01/2019	21/01/2019	F	53	Campo Grande	MS	19	Dengue with no alarm sign
<b>CG105</b>	DENV2	Serum	27/01/2019	24/01/2019	F	31	Campo Grande	MS	19	Dengue with no alarm sign
<b>CG106</b>	DENV2	Serum	24/01/2019	21/01/2019	F	16	Campo Grande	MS	17	Dengue with no alarm sign
<b>CG107</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	29/01/2019	M	18	Campo Grande	MS	22	Dengue with no alarm sign
<b>CG108</b>	DENV2	Serum	26/03/2019	24/03/2019	M	58	Maracajú	MS	20	Dengue with no alarm sign
<b>CG109</b>	DENV2	Serum	26/01/2019	23/01/2019	F	52	Campo Grande	MS	18	Dengue with no alarm sign
<b>CG110</b>	DENV2	Serum	04/03/2019	01/03/2019	F	25	Campo Grande	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG111</b>	DENV2	Serum	26/03/2019	25/03/2019	M	13	Corumbá	MS	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG112</b>	DENV2	Lymph node	11/04/2019	08/04/2019	F	7	Campo Grande	MS	24	Death
<b>CG116</b>	DENV2	Serum	15/01/2019	13/01/2019	M	13	Campo Grande	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG117</b>	DENV2	Serum	31/01/2019	30/01/2019	M	70	Campo Grande	MS	21	Dengue with no alarm sign
<b>CG119</b>	DENV2	Serum	19/01/2019	17/01/2019	M	37	Campo Grande	MS	16	Dengue with no alarm sign
<b>CG120</b>	DENV2	Serum	26/01/2019	22/01/2019	M	13	Campo Grande	MS	30	Dengue with no alarm sign
<b>CG121</b>	DENV2	Serum	18/03/2019	15/03/2019	F	7	Pedro Gomes	MS	24	Dengue with no alarm sign
<b>CG122</b>	DENV2	Serum	15/03/2019	13/03/2019	M	35	Nioaque	MS	34	Dengue with no alarm sign
<b>CG123</b>	DENV2	Serum	19/03/2019	19/03/2019	F	58	Chapadão do Sul	MS	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG124</b>	DENV2	Serum	18/03/2019	16/03/2019	M	53	Nioaque	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CG125</b>	DENV2	Serum	15/03/2019	14/03/2019	F	16	Dois Irmãos do Buriti	MS	24	Dengue with no alarm sign
<b>CG126</b>	DENV2	Serum	20/03/2019	16/03/2019	M	24	Ivinhema	MS	24	Dengue with no alarm sign
<b>CG128</b>	DENV2	Serum	13/03/2019	11/03/2019	F	65	Maracajú	MS	23	Dengue with no alarm sign
<b>CG129</b>	DENV2	Serum	11/02/2019	10/02/2019	F	14	Água Clara	MS	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG130</b>	DENV2	Serum	15/03/2019	14/03/2019	M	21	Nioaque	MS	17	Dengue with no alarm sign
<b>CG132</b>	DENV2	Serum	26/04/2019	23/04/2019	M	38	Campo Grande	MS	25	Dengue with no alarm sign
<b>CG133</b>	DENV2	Serum	19/03/2019	17/03/2019	F	39	Itaquiraí	MS	29	Dengue with no alarm sign
<b>CG134</b>	DENV2	Serum	10/01/2019	09/01/2019	F	23	Campo Grande	MS	26	Dengue with no alarm sign
<b>CB02</b>	DENV2	Serum	18/02/2019	15/02/2019	M	36	Nova Xavantina	MT	23	Dengue with no alarm sign
<b>CB03</b>	DENV2	Serum	02/03/2019	27/02/2019	M	21	Cuiaba	MT	31	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 145</b>	DENV2	Serum	09/05/2019	09/05/2019	M	45	Custódia	PE	28	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 147</b>	DENV2	Serum	31/05/2019	27/05/2019	F	34	Santa Maria da Boa Vista	PE	27	Dengue with no alarm sign

<b>OPAS 164</b>	DENV2	Serum	27/06/2019	23/06/2019	F	8	Jaboatão dos Guararapes	PE	29	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 172</b>	DENV2	Serum	25/01/2016	28/01/2016	M	25	Ribeirão Preto	SP	27	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 176</b>	DENV2	Serum	19/02/2016	26/02/2016	M	25	Ribeirão Preto	SP	35	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 177</b>	DENV2	Serum	01/03/2016	08/03/2016	M	54	Ribeirão Preto	SP	28	Dengue with no alarm sign
<b>OPAS 178</b>	DENV2	Serum	14/01/2019	11/01/2019	F	38	Vassouras	RJ	27	Dengue with no alarm sign

ID=study identifier; Collection date=Sample collection date; Municipality=Municipality of residence; State=BA-Bahia; DF-Distrito Federal; GO-Goiás; MG-Minas Gerais; MS-Mato Grosso do Sul; MT-Mato Grosso do Sul; PE-Pernambuco; SP-São Paulo; RJ-Rio de Janeiro; Ct=RT-qPCR quantification cycle threshold value; NA=Not Applicable.



**Supplementary Table 3. Sequencing statistics for the 227 DENV1 and DENV2 sequences generated in this study.**

<b>ID</b>	<b>Serotype</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Reads</b>	<b>Coverage (%)</b>	<b>GenBank link</b>
<b>OPAS 41</b>	DENV1	MT929530	1148	67.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929530">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929530</a>
<b>OPAS 42</b>	DENV1	MT929531	38409	89.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929531">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929531</a>
<b>OPAS 43</b>	DENV1	MT929532	47835	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929532">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929532</a>
<b>OPAS 44</b>	DENV1	MT929533	32466	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929533">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929533</a>
<b>OPAS 45</b>	DENV1	MT929534	34796	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929534">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929534</a>
<b>OPAS 46</b>	DENV1	MT929535	60684	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929535">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929535</a>
<b>OPAS 47</b>	DENV1	MT929536	60872	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929536">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929536</a>
<b>OPAS 48</b>	DENV1	MT929537	44516	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929537">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929537</a>
<b>OPAS 49</b>	DENV1	MT929538	25874	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929538">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929538</a>
<b>OPAS 50</b>	DENV1	MT929539	17230	89.4	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929539">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929539</a>
<b>OPAS 56</b>	DENV1	MT929540	36579	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929540">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929540</a>
<b>OPAS 57</b>	DENV1	MT929541	34262	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929541">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929541</a>
<b>OPAS 58</b>	DENV1	MT929542	13742	85.4	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929542">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929542</a>
<b>OPAS 60</b>	DENV1	MT929543	25105	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929543">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929543</a>
<b>OPAS 61</b>	DENV1	MT929544	23023	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929544">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929544</a>
<b>OPAS 62</b>	DENV1	MT929545	33004	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929545">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929545</a>
<b>OPAS 63</b>	DENV1	MT929546	25770	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929546">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929546</a>
<b>OPAS 64</b>	DENV1	MT929547	34030	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929547">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929547</a>
<b>OPAS 65</b>	DENV1	MT929548	30509	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929548">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929548</a>
<b>OPAS 157</b>	DENV1	MT929573	42518	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929573">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929573</a>
<b>OPAS 158</b>	DENV1	MT929574	36165	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929574">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929574</a>
<b>GO03</b>	DENV1	MT929528	22569	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929528">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929528</a>
<b>GO04</b>	DENV1	MT929529	28354	89.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929529">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929529</a>
<b>OPAS 131</b>	DENV1	MT929556	67644	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929556">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929556</a>
<b>OPAS 132</b>	DENV1	MT929557	86925	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929557">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929557</a>
<b>OPAS 133</b>	DENV1	MT929558	80673	89.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929558">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929558</a>
<b>OPAS 134</b>	DENV1	MT929559	54060	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929559">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929559</a>
<b>OPAS 135</b>	DENV1	MT929560	81799	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929560">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929560</a>
<b>OPAS 136</b>	DENV1	MT929561	66262	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929561">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929561</a>
<b>OPAS 137</b>	DENV1	MT929562	60855	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929562">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929562</a>
<b>OPAS 138</b>	DENV1	MT929563	70760	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929563">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929563</a>

<b>OPAS 90</b>	DENV1	MT929549	58872	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929549">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929549</a>
<b>OPAS 92</b>	DENV1	MT929550	60850	94.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929550">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929550</a>
<b>OPAS 99</b>	DENV1	MT929551	74959	78.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929551">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929551</a>
<b>OPAS 100</b>	DENV1	MT929552	66474	86.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929552">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929552</a>
<b>OPAS 101</b>	DENV1	MT929553	82037	80.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929553">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929553</a>
<b>OPAS 102</b>	DENV1	MT929554	81787	94.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929554">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929554</a>
<b>OPAS 103</b>	DENV1	MT929555	73129	89.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929555">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929555</a>
<b>OPAS 165</b>	DENV1	MT929577	38272	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929577">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929577</a>
<b>OPAS 167</b>	DENV1	MT929578	44365	93.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929578">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929578</a>
<b>OPAS 168</b>	DENV1	MT929579	41920	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929579">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929579</a>
<b>OPAS 169</b>	DENV1	MT929580	37728	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929580">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929580</a>
<b>OPAS 148</b>	DENV1	MT929564	73395	89.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929564">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929564</a>
<b>OPAS 149</b>	DENV1	MT929565	74685	70.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929565">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929565</a>
<b>OPAS 150</b>	DENV1	MT929566	80594	75.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929566">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929566</a>
<b>OPAS 151</b>	DENV1	MT929567	29271	82.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929567">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929567</a>
<b>OPAS 152</b>	DENV1	MT929568	79935	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929568">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929568</a>
<b>OPAS 153</b>	DENV1	MT929569	45364	82.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929569">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929569</a>
<b>OPAS 154</b>	DENV1	MT929570	75476	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929570">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929570</a>
<b>OPAS 155</b>	DENV1	MT929571	30379	91.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929571">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929571</a>
<b>OPAS 156</b>	DENV1	MT929572	126739	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929572">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929572</a>
<b>OPAS 162</b>	DENV1	MT929575	26821	85.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929575">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929575</a>
<b>OPAS 163</b>	DENV1	MT929576	236906	77.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929576">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929576</a>
<b>OPAS 171</b>	DENV1	MT929581	31506	78.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929581">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929581</a>
<b>OPAS 173</b>	DENV1	MT929582	9180	74.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929582">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929582</a>
<b>OPAS 174</b>	DENV1	MT929583	34410	78.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929583">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929583</a>
<b>OPAS 175</b>	DENV1	MT929584	23241	94.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929584">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929584</a>
<b>OPAS 51</b>	DENV2	MT929688	22430	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929688">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929688</a>
<b>OPAS 52</b>	DENV2	MT929689	26105	84.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929689">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929689</a>
<b>OPAS 53</b>	DENV2	MT929690	24082	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929690">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929690</a>
<b>OPAS 54</b>	DENV2	MT929691	20538	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929691">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929691</a>
<b>OPAS 55</b>	DENV2	MT929692	25194	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929692">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929692</a>
<b>OPAS 110</b>	DENV2	MT929722	78479	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929722">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929722</a>
<b>OPAS 111</b>	DENV2	MT929723	127120	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929723">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929723</a>
<b>OPAS 112</b>	DENV2	MT929724	75160	77.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929724">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929724</a>
<b>OPAS 113</b>	DENV2	MT929725	89452	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929725">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929725</a>
<b>OPAS 114</b>	DENV2	MT929726	80250	85.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929726">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929726</a>

<b>OPAS 115</b>	DENV2	MT929727	96331	73.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929727">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929727</a>
<b>OPAS 116</b>	DENV2	MT929728	76730	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929728">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929728</a>
<b>OPAS 117</b>	DENV2	MT929729	74632	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929729">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929729</a>
<b>OPAS 118</b>	DENV2	MT929730	74663	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929730">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929730</a>
<b>OPAS 119</b>	DENV2	MT929731	71196	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929731">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929731</a>
<b>OPAS 120</b>	DENV2	MT929732	69618	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929732">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929732</a>
<b>OPAS 121</b>	DENV2	MT929733	73302	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929733">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929733</a>
<b>OPAS 122</b>	DENV2	MT929734	76102	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929734">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929734</a>
<b>OPAS 123</b>	DENV2	MT929735	62619	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929735">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929735</a>
<b>OPAS 124</b>	DENV2	MT929736	78826	80.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929736">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929736</a>
<b>OPAS 161</b>	DENV2	MT929749	11924	69.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929749">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929749</a>
<b>GO72</b>	DENV2	MT929646	33490	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929646">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929646</a>
<b>GO75</b>	DENV2	MT929647	29201	92.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929647">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929647</a>
<b>OPAS 66</b>	DENV2	MT929693	25861	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929693">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929693</a>
<b>OPAS 67</b>	DENV2	MT929694	53737	93.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929694">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929694</a>
<b>OPAS 68</b>	DENV2	MT929695	76127	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929695">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929695</a>
<b>OPAS 69</b>	DENV2	MT929696	77345	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929696">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929696</a>
<b>OPAS 70</b>	DENV2	MT929697	53087	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929697">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929697</a>
<b>OPAS 71</b>	DENV2	MT929698	68171	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929698">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929698</a>
<b>OPAS 72</b>	DENV2	MT929699	62398	76.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929699">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929699</a>
<b>OPAS 74</b>	DENV2	MT929700	69451	93.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929700">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929700</a>
<b>OPAS 75</b>	DENV2	MT929701	59345	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929701">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929701</a>
<b>OPAS 76</b>	DENV2	MT929702	61310	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929702">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929702</a>
<b>OPAS 77</b>	DENV2	MT929703	52796	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929703">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929703</a>
<b>OPAS 78</b>	DENV2	MT929704	53603	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929704">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929704</a>
<b>OPAS 79</b>	DENV2	MT929705	72112	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929705">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929705</a>
<b>OPAS 80</b>	DENV2	MT929706	58137	93.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929706">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929706</a>
<b>OPAS 81</b>	DENV2	MT929707	55335	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929707">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929707</a>
<b>OPAS 82</b>	DENV2	MT929708	66133	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929708">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929708</a>
<b>OPAS 83</b>	DENV2	MT929709	63357	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929709">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929709</a>
<b>OPAS 84</b>	DENV2	MT929710	79443	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929710">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929710</a>
<b>OPAS 85</b>	DENV2	MT929711	59880	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929711">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929711</a>
<b>OPAS 86</b>	DENV2	MT929712	82765	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929712">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929712</a>
<b>OPAS 87</b>	DENV2	MT929713	73573	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929713">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929713</a>
<b>OPAS 89</b>	DENV2	MT929714	91026	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929714">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929714</a>
<b>OPAS 125</b>	DENV2	MT929737	67578	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929737">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929737</a>

<b>OPAS 126</b>	DENV2	MT929738	20234	69.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929738">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929738</a>
<b>OPAS 127</b>	DENV2	MT929739	14215	79.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929739">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929739</a>
<b>OPAS 128</b>	DENV2	MT929740	24790	82.4	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929740">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929740</a>
<b>OPAS 129</b>	DENV2	MT929741	35067	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929741">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929741</a>
<b>OPAS 130</b>	DENV2	MT929742	33004	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929742">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929742</a>
<b>OPAS 139</b>	DENV2	MT929743	36363	93.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929743">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929743</a>
<b>OPAS 140</b>	DENV2	MT929744	13891	70.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929744">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929744</a>
<b>OPAS 142</b>	DENV2	MT929745	9452	83.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929745">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929745</a>
<b>OPAS 159</b>	DENV2	MT929748	16501	75.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929748">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929748</a>
<b>OPAS 01</b>	DENV2	MT929648	67212	86.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929648">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929648</a>
<b>OPAS 02</b>	DENV2	MT929649	79407	88.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929649">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929649</a>
<b>OPAS 03</b>	DENV2	MT929650	64014	87.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929650">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929650</a>
<b>OPAS 04</b>	DENV2	MT929651	64749	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929651">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929651</a>
<b>OPAS 05</b>	DENV2	MT929652	54742	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929652">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929652</a>
<b>OPAS 06</b>	DENV2	MT929653	55680	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929653">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929653</a>
<b>OPAS 07</b>	DENV2	MT929654	66199	91.4	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929654">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929654</a>
<b>OPAS 08</b>	DENV2	MT929655	79984	86.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929655">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929655</a>
<b>OPAS 09</b>	DENV2	MT929656	51403	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929656">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929656</a>
<b>OPAS 10</b>	DENV2	MT929657	64173	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929657">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929657</a>
<b>OPAS 11</b>	DENV2	MT929658	40468	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929658">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929658</a>
<b>OPAS 12</b>	DENV2	MT929659	63797	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929659">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929659</a>
<b>OPAS 13</b>	DENV2	MT929660	61680	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929660">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929660</a>
<b>OPAS 14</b>	DENV2	MT929661	55153	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929661">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929661</a>
<b>OPAS 15</b>	DENV2	MT929662	49508	90.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929662">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929662</a>
<b>OPAS 16</b>	DENV2	MT929663	61994	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929663">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929663</a>
<b>OPAS 17</b>	DENV2	MT929664	37366	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929664">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929664</a>
<b>OPAS 18</b>	DENV2	MT929665	34881	66.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929665">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929665</a>
<b>OPAS 19</b>	DENV2	MT929666	46152	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929666">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929666</a>
<b>OPAS 20</b>	DENV2	MT929667	64056	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929667">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929667</a>
<b>OPAS 21</b>	DENV2	MT929668	42803	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929668">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929668</a>
<b>OPAS 22</b>	DENV2	MT929669	51459	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929669">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929669</a>
<b>OPAS 23</b>	DENV2	MT929670	49658	92.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929670">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929670</a>
<b>OPAS 24</b>	DENV2	MT929671	13142	60.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929671">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929671</a>
<b>OPAS 25</b>	DENV2	MT929672	9737	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929672">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929672</a>
<b>OPAS 26</b>	DENV2	MT929673	10315	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929673">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929673</a>
<b>OPAS 27</b>	DENV2	MT929674	13660	73.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929674">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929674</a>



<b>OPAS 28</b>	DENV2	MT929675	11857	89.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929675">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929675</a>
<b>OPAS 29</b>	DENV2	MT929676	9867	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929676">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929676</a>
<b>OPAS 30</b>	DENV2	MT929677	11290	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929677">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929677</a>
<b>OPAS 31</b>	DENV2	MT929678	12548	73.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929678">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929678</a>
<b>OPAS 32</b>	DENV2	MT929679	7967	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929679">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929679</a>
<b>OPAS 33</b>	DENV2	MT929680	11544	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929680">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929680</a>
<b>OPAS 34</b>	DENV2	MT929681	13239	93.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929681">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929681</a>
<b>OPAS 35</b>	DENV2	MT929682	11617	89.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929682">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929682</a>
<b>OPAS 36</b>	DENV2	MT929683	19614	73.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929683">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929683</a>
<b>OPAS 37</b>	DENV2	MT929684	16382	88.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929684">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929684</a>
<b>OPAS 38</b>	DENV2	MT929685	14810	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929685">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929685</a>
<b>OPAS 39</b>	DENV2	MT929686	18506	83.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929686">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929686</a>
<b>OPAS 40</b>	DENV2	MT929687	16077	66.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929687">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929687</a>
<b>OPAS 93</b>	DENV2	MT929715	67656	88.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929715">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929715</a>
<b>OPAS 95</b>	DENV2	MT929716	81051	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929716">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929716</a>
<b>OPAS 96</b>	DENV2	MT929717	86395	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929717">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929717</a>
<b>OPAS 105</b>	DENV2	MT929718	85629	86.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929718">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929718</a>
<b>OPAS 106</b>	DENV2	MT929719	71717	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929719">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929719</a>
<b>OPAS 107</b>	DENV2	MT929720	72564	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929720">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929720</a>
<b>OPAS 108</b>	DENV2	MT929721	84260	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929721">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929721</a>
<b>CG02</b>	DENV2	MT929587	58997	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929587">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929587</a>
<b>CG06</b>	DENV2	MT929588	70195	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929588">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929588</a>
<b>CG07</b>	DENV2	MT929589	41807	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929589">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929589</a>
<b>CG08</b>	DENV2	MT929590	65721	67.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929590">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929590</a>
<b>CG09</b>	DENV2	MT929591	47818	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929591">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929591</a>
<b>CG10</b>	DENV2	MT929592	49514	73.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929592">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929592</a>
<b>CG11</b>	DENV2	MT929593	42961	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929593">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929593</a>
<b>CG12</b>	DENV2	MT929594	21079	73.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929594">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929594</a>
<b>CG13</b>	DENV2	MT929595	34494	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929595">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929595</a>
<b>CG14</b>	DENV2	MT929596	54053	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929596">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929596</a>
<b>CG15</b>	DENV2	MT929597	53455	79.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929597">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929597</a>
<b>CG16</b>	DENV2	MT929598	27224	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929598">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929598</a>
<b>CG17</b>	DENV2	MT929599	49155	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929599">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929599</a>
<b>CG18</b>	DENV2	MT929600	43608	73.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929600">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929600</a>
<b>CG19</b>	DENV2	MT929601	27042	82.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929601">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929601</a>
<b>CG20</b>	DENV2	MT929602	43832	73.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929602">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929602</a>

<b>CG21</b>	DENV2	MT929603	22422	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929603">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929603</a>
<b>CG22</b>	DENV2	MT929604	21798	73.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929604">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929604</a>
<b>CG23</b>	DENV2	MT929605	42692	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929605">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929605</a>
<b>CG24</b>	DENV2	MT929606	37019	93.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929606">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929606</a>
<b>CG68</b>	DENV2	MT929607	101708	83.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929607">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929607</a>
<b>CG69</b>	DENV2	MT929608	72620	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929608">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929608</a>
<b>CG70</b>	DENV2	MT929609	116881	84.6	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929609">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929609</a>
<b>CG71</b>	DENV2	MT929610	5307	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929610">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929610</a>
<b>CG81</b>	DENV2	MT929611	166110	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929611">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929611</a>
<b>CG86</b>	DENV2	MT929612	114276	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929612">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929612</a>
<b>CG87</b>	DENV2	MT929613	4710	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929613">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929613</a>
<b>CG90</b>	DENV2	MT929614	103971	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929614">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929614</a>
<b>CG94</b>	DENV2	MT929615	134892	80.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929615">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929615</a>
<b>CG96</b>	DENV2	MT929616	148786	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929616">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929616</a>
<b>CG99</b>	DENV2	MT929617	120232	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929617">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929617</a>
<b>CG100</b>	DENV2	MT929618	116370	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929618">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929618</a>
<b>CG102</b>	DENV2	MT929619	55098	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929619">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929619</a>
<b>CG103</b>	DENV2	MT929620	50051	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929620">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929620</a>
<b>CG104</b>	DENV2	MT929621	5237	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929621">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929621</a>
<b>CG105</b>	DENV2	MT929622	30959	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929622">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929622</a>
<b>CG106</b>	DENV2	MT929623	110736	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929623">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929623</a>
<b>CG107</b>	DENV2	MT929624	1001632	73.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929624">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929624</a>
<b>CG108</b>	DENV2	MT929625	88602	88.4	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929625">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929625</a>
<b>CG109</b>	DENV2	MT929626	57723	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929626">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929626</a>
<b>CG110</b>	DENV2	MT929627	82777	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929627">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929627</a>
<b>CG111</b>	DENV2	MT929628	72903	88.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929628">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929628</a>
<b>CG112</b>	DENV2	MT929629	59051	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929629">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929629</a>
<b>CG116</b>	DENV2	MT929630	48670	87.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929630">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929630</a>
<b>CG117</b>	DENV2	MT929631	43758	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929631">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929631</a>
<b>CG119</b>	DENV2	MT929632	66890	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929632">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929632</a>
<b>CG120</b>	DENV2	MT929633	50837	88.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929633">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929633</a>
<b>CG121</b>	DENV2	MT929634	123428	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929634">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929634</a>
<b>CG122</b>	DENV2	MT929635	150786	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929635">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929635</a>
<b>CG123</b>	DENV2	MT929636	98764	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929636">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929636</a>
<b>CG124</b>	DENV2	MT929637	19138	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929637">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929637</a>
<b>CG125</b>	DENV2	MT929638	44351	85.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929638">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT929638</a>

<b>CG126</b>	DENV2	MT929639	26287	73.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929639">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929639</a>
<b>CG128</b>	DENV2	MT929640	38678	87.9	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929640">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929640</a>
<b>CG129</b>	DENV2	MT929641	45603	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929641">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929641</a>
<b>CG130</b>	DENV2	MT929642	39445	93.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929642">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929642</a>
<b>CG132</b>	DENV2	MT929643	39587	87.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929643">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929643</a>
<b>CG133</b>	DENV2	MT929644	83438	88.2	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929644">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929644</a>
<b>CG134</b>	DENV2	MT929645	45255	88.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929645">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929645</a>
<b>CB02</b>	DENV2	MT929585	36474	51.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929585">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929585</a>
<b>CB03</b>	DENV2	MT929586	32227	47.8	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929586">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929586</a>
<b>OPAS 145</b>	DENV2	MT929746	85028	74.3	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929746">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929746</a>
<b>OPAS 147</b>	DENV2	MT929747	62082	73.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929747">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929747</a>
<b>OPAS 164</b>	DENV2	MT929750	16602	79.5	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929750">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929750</a>
<b>OPAS 172</b>	DENV2	MT929751	21448	93.7	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929751">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929751</a>
<b>OPAS 176</b>	DENV2	MT929752	3243	74.4	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929752">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929752</a>
<b>OPAS 177</b>	DENV2	MT929753	154641	94.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929753">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929753</a>
<b>OPAS 178</b>	DENV2	MT929754	23384	89.1	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929754">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT929754</a>

ID=study identifier; Accession Number=NCBI accession number

**Supplementary Table 4. Genetic signatures for BR-4 lineages I and II.**

<b>SNV</b>	<b>nn position</b>	<b>Protein</b>	<b>nn position</b>	<b>aa position</b>	<b>aa LinI</b>	<b>aa LinII</b>	<b>codon LinI</b>	<b>codon LinII</b>
1	450	membrane glycoprotein precursor prM	12	4	T	T	acc	act
2	954	envelope protein E	18	6	I	I	ata	atc
3	1986	envelope protein E	1050	350	R	R	cgc	cgc
4	2223	envelope protein E	1287	429	F	F	ttt	ttc
5	2276	envelope protein E	1340	447	V	A	gtt	gct
6	2319	envelope protein E	1383	461	V	V	gtc	gta
7	2448	nonstructural protein NS1	27	9	K	K	aaa	aag
8	3330	nonstructural protein NS1	909	303	A	A	gcc	gct
9	4341	nonstructural protein NS2B	210	70	S	S	agt	agc
10	4482	nonstructural protein NS2B	351	117	T	T	acg	aca
11	4974	nonstructural protein NS3	453	151	G	G	ggg	ggc
12	5190	nonstructural protein NS3	669	223	P	P	ccc	cct
13	5304	nonstructural protein NS3	783	261	C	C	tgt	tgc
14	5730	nonstructural protein NS3	1209	403	D	D	gat	gac
15	5835	nonstructural protein NS3	1314	438	E	E	gaa	gag
16	6966	nonstructural protein NS4B	141	47	F	F	ttt	ttt
17	7038	nonstructural protein NS4B	213	71	Q	Q	cag	caa
18	7059	nonstructural protein NS4B	234	78	L	L	ctt	ctc
19	7137	nonstructural protein NS4B	312	104	P	P	cct	ccc
20	7656	RNA-dependent RNA polymerase NS5	87	29	K	K	aag	aag
21	7758	RNA-dependent RNA polymerase NS5	189	63	R	R	agg	aga
22	7999	RNA-dependent RNA polymerase NS5	430	144	L	L	ctg	ttg
23	8298	RNA-dependent RNA polymerase NS5	729	243	F	F	ttc	ttt
24	8658	RNA-dependent RNA polymerase NS5	1089	363	T	T	act	acc
25	9208	RNA-dependent RNA polymerase NS5	1639	547	L	L	tta	cta
26	9226	RNA-dependent RNA polymerase NS5	1657	553	V	I	gta	ata



<b>27</b>	9303	RNA-dependent RNA polymerase NS5	1734	578	V	V	gtg	gtg
<b>28</b>	9399	RNA-dependent RNA polymerase NS5	1830	610	N	N	aat	aac
<b>29</b>	9424	RNA-dependent RNA polymerase NS5	1855	619	L	L	tta	cta
<b>30</b>	9576	RNA-dependent RNA polymerase NS5	2007	669	P	P	cct	ccc
<b>31</b>	9660	RNA-dependent RNA polymerase NS5	2091	697	S	S	tct	tca
<b>32</b>	9725	RNA-dependent RNA polymerase NS5	2156	719	I	K	ata	aaa
<b>33</b>	9795	RNA-dependent RNA polymerase NS5	2226	742	Q	Q	cag	caa
<b>34</b>	9942	RNA-dependent RNA polymerase NS5	2373	791	S	S	agc	agt

SNV=single nucleotide variant; nn=nucleotide; aa=amino acid; LinI=BR-4 lineage I; LinII=BR-4 lineage II

**Supplementary Table 5. Primers for sequencing the complete genomes of DENV1 and DENV2.**

<b>Primer Name</b>	<b>Sequence (5'-3')*</b>
DENV1_1_LEFT	AATATGCTGAAACGCGCGAGAA
DENV1_1_RIGHT	CCGTCTTCAAGAGTTCAATGTCCA
DENV1_2_LEFT	ACCCAGGATTCACGGTGATAGC
DENV1_2_RIGHT	ACCAGCAAATCTTGTCTGTTCCA
DENV1_3_LEFT	GGAAATACAGCTGACCGACTACG
DENV1_3_RIGHT	ACTGCAATGCACGTCATCGAAA
DENV1_4_LEFT	CAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGA
DENV1_4_RIGHT	TTGATGGCAGCTGACATTAGCC
DENV1_5_LEFT	TGGAACATTTGGGAAGTTGAGGAC
DENV1_5_RIGHT	ACTTCTCTGGATGTTAGTCTGCG
DENV1_6_LEFT	TGGATGAACATTGTGGAAATCGAGG
DENV1_6_RIGHT	GCATGCCTCCAGCTATTAGTGG
DENV1_7_LEFT	AGTTGGCCCCTCAATGAAGGAA
DENV1_7_RIGHT	GCACTGACGTAGGTTCCACTTG
DENV1_8_LEFT	TCTCATATGGAGGAGGTTGGAGG
DENV1_8_RIGHT	AGCCTGAGTTCCATGATCTCTCA
DENV1_9_LEFT	ATAGCGGCCAGAGGGTACATCT
DENV1_9_RIGHT	TGTTCTCCTCCAACACCTGGTT
DENV1_10_LEFT	AAAGAGTGCAGCAATAGACGGG
DENV1_10_RIGHT	ATAGAGGGTCCAGGCTGAAGCT
DENV1_11_LEFT	TGTGGTGATAGGTTTGTATTTCATGATACT
DENV1_11_RIGHT	CTTTGGCTTCGGATCTGTCCAC
DENV1_12_LEFT	GGGAAACACTGGGAGAGAAATGG
DENV1_12_RIGHT	TGATCCTGATGGCTTGACCTCA
DENV1_13_LEFT	TGGAGCAAATGCAAAGAAAACATGG
DENV1_13_RIGHT	TGCACGACTTCCTTTTGCCTTT
DENV1_14_LEFT	ACTCAGCAAAGAAGCAGTGGA
DENV1_14_RIGHT	GCATGGCACCCTATTTCCCTC
DENV1_15_LEFT	AGACGTGACCAGAGAGGAAGTG
DENV1_15_RIGHT	TCACTTGGTTTATGGCCACTTGT
DENV2_1_LEFT	AGCAGATCTCTGATGAATAACCAACG
DENV2_1_RIGHT	TTTTTGCCATCGTCGTACACA
DENV2_2_LEFT	TCGCTCCTTCAATGACAATGCG
DENV2_2_RIGHT	CCATTCTCAGCCTGCACTTGAG

DENV2_3_LEFT	ACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCC
DENV2_3_RIGHT	TGAAGGGGATTCTGGTTGGAAC
DENV2_4_LEFT	ATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTG
DENV2_4_RIGHT	CGGCAGCACCATTCTGTTATGA
DENV2_5_LEFT	TCATGCAGGCAGGAAAACGATC
DENV2_5_RIGHT	TCTCAAGAGTAGTCCAGCTGCA
DENV2_6_LEFT	TGGAAATCAGACCATTGAAAGAGAAAGA
DENV2_6_RIGHT	TGGTCAGTGTGTTGTTCTTCTCTT
DENV2_7_LEFT	CCAATCCTGTCAATAACAATATCAGAAGAT
DENV2_7_RIGHT	TGATGGCTGGGGTTTGGTATCT
DENV2_8_LEFT	AGATCGAAGATGACATTTTCCGAAAGA
DENV2_8_RIGHT	CCCATGTATATGTAAGTGGTCATTTTCATT
DENV2_9_LEFT	ATGCCAGTGACCCACTCTAGTG
DENV2_9_RIGHT	CCACCACTGTGAGGATGGCTAT
DENV2_10_LEFT	ACCAGAAAAACAGAGAACACCCC
DENV2_10_RIGHT	CCACTTCTGGATTCCACTTTTCT
DENV2_11_LEFT	GGAGCTGGACTTCTCTTTTCCAT
DENV2_11_RIGHT	GACGTCCCAAGGTTTTGTCAGC
DENV2_12_LEFT	AGAGCATGAAACATCATGGCACT
DENV2_12_RIGHT	GTGCCTCTTGGTGTGTTGGTCTTT
DENV2_13_LEFT	TGGGACACAAGAATCACACTAGAAG
DENV2_13_RIGHT	CCGCACCATTGGTCTTCTCTTT

\*Primers designed by the CADDE project (<https://www.caddecentre.org/>).

**Supplementary Table 6. Members of Latin American Genomic Surveillance Arboviral Network.**

<b>Complete name</b>	<b>Affiliation</b>
Erenilde Marques de Cerqueira	Universidade Estadual de Feira de Santana, Salvador, Bahia, Brazil
Tiago Graf	Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil
Walter Ramalho	Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil
Wildo Navegantes	Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil
Renato Barbosa Reis	Universidade Salvador, Salvador, Bahia, Brazil
Clara Guerra Duarte	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Maira Alves Pereira	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Paulo Eduardo de Souza da Silva	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Raoni Almeida de Souza	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Alex Pauvolid-Corrêa	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Anne Aline Pereira de Paiva	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Hegger Machado Fritsch	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Maria Angélica Mares-Guia	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Maria Celeste Torres	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Maurício Teixeira Lima	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Patrícia Sequeira	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
William de Almeida Marques	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Jorlan Fernandes de Jesus	Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Felipe Gomes Naveca	Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, Amazonas, Brazil
Alessandra Lima Silva	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Anne Cybelle Pinto	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Arun Kumar Jaiswal	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Élisson Nogueira Lopes	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Francielly Morais Rodrigues da Costa	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Gabriel Quintanilha-Peixoto	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Gilson Carlos Soares	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

	Brazil
Paula Luize Camargos Fonseca	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Renan Pedra de Souza	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Rodrigo Bentes Kato	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Rodrigo Profeta Silveira Santos	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Sandeep Tiwari	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Wylerson Guimarães Nogueira	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Beatriz Senra Álvares da Silva Santos	Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Bruna Lopes Bueno	Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Isadora Cristina de Siqueira	Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil
Lourdes Farre Vallve	Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil
Melina Mosquera Navarro Borba	Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil
Alix Sandra Mazzetto	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
Francisco de Assis Araújo Aguiar	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil
Irenio da Silva Gomes	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil
Jayra Juliana Paiva Alves Abrantes	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil
Luiz Takao Watanabe	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil
Marta Ferreira da Silva Rego	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Muniz, Salvador, Bahia, Brazil
Vanessa Brandão Nardy	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Muniz, Salvador, Bahia, Brazil
Shirlei Ferreira de Aguiar	Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Fabiana Cristina Pereira dos Santos	Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brazil
Alice Louize Nunes Queiroz	Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil
Bruno Tardelli Diniz Nunes	Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil
Lívia Carício Martins	Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil
Márcio Roberto Teixeira Nunes	Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil
Flávia Cristina da Silva Salles	Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil
Ingra Morales Claro	Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil
Jaqueline Goes de Jesus	Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil
Darlan da Silva Cândido	Department of Zoology, Peter Medawar Building, University of Oxford, Oxford, United Kingdom
Cintia Marcela Fabbri	Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio Maiztegui, Pergamino, Argentina
Claudia González	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama
Lisbeth Saéz	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama
María Chen-Germán	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama
Jaime Lagos Barrera	Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile
José Ernesto Ramírez-González	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Báez, Ciudad de México, México
Josefina Campos	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr Carlos G Malbrán, Buenos Aires, Argentina

Noelia Morel Faller	Ministerio de Salud Pública de Uruguay, Montevideo, Uruguay
Marta Eugenia Víquez Villalobos	Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza em Nutrición y Salud, Tres Ríos, Costa Rica
Roberto Kaslin	Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica Dr Leopoldo Izquieta Pérez, Guayaquil, Ecuador
Silvia Paola Salgado Cisneros	Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica Dr Leopoldo Izquieta Pérez, Guayaquil, Ecuador
Flávia Figueira Aburjaile	Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
Carolina Dourado Amaral	Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Danielle Bandeira Costa de Sousa Freire	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil
Laura Nogueira Cruz	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil
Daniel Mattos	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Leandro Ferreira Lopes Landeira	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Mariane Talon de Menezes	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Ieda Maria Orioli	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Ariane Coelho Ferraz	Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
Daiane Teixeira de Oliveira	Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
Alexandre Barbosa Reis	Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
Renata Guerra de Sá Cota	Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
Rafael dos Santos Bezerra	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
Melissa Barreto Falcão	Secretaria de Saúde de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil
Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho	Sechenov First Moscow State Medical University, Moscou, Russia

## Supplementary Text File 1

### ***Course “Nanopore-based genome sequencing technology for temporal investigation and epidemiology of dengue outbreak: training, research, surveillance, and scientific dissemination”***

Recent progress in the sequencing of Ebola, Zika, and yellow fever viruses using Oxford Nanopore sequencing technology have shown that high quality complete genome sequences can be generated in real time during viral outbreaks and epidemics.<sup>1-3</sup> Portability and rapid production of data allows generation of genomes at the source of outbreaks, which in turn facilitate rapid intervention. Considering this and the strengthening of surveillance actions in Latin America, the Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO), together with the Brazilian Ministry of Health (BrMoH), planned the course entitled “Nanopore-based genome sequencing technology for temporal investigation and epidemiology of dengue outbreak: training, research, surveillance, and scientific dissemination”, under the coordination of Prof. Dr. Luiz Alcantara, researcher at Fundação Oswaldo Cruz (<https://portal.fiocruz.br/>).

The course took place in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais state, from August 19 to 30, 2019 and it aimed at carrying out activities central to arbovirus genomic surveillance, focusing on the training of participants, dissemination of knowledge, and scientific communication. The course was taught by experienced researchers from national and international institutions, such as Oxford University (United Kingdom), University of KwaZulu-Natal (South Africa), Universidade Nova de Lisboa (Portugal), Sechenov First Moscow State Medical University (Russia), Oswaldo Cruz Foundation (Brazil), Federal University of Minas Gerais (Brazil), Federal University of Rio de Janeiro (Brazil), Federal University of Pernambuco (Brazil), University of São Paulo (Brazil), University of Brasilia (Brazil), State University of Feira de Santana (Brazil), and University of Salvador (Brazil). The course had 62 students from 34 national and international institutions. In addition to post-graduate students, course participants included laboratory technicians and health practitioners in universities and laboratories from several institutions responsible for laboratory-based surveillance of emerging and reemerging diseases,

such as the Central Public Health Laboratories of the Brazilian states from the BrMoH's public laboratories network and public health laboratories from Paraguay, Argentina, Panama, Chile, Mexico, Uruguay, Costa Rica, and Ecuador.

The course lasted two weeks and comprised theoretical and practical classes focused on genomic surveillance of dengue (DENV1 and DENV2 serotypes), which was responsible for a large epidemic in 2019, accounting for 1,544,987 cases reported in Brazil.<sup>4</sup> The first week of training addressed the genomic sequencing protocol using Nanopore technology and analysis of clinical and epidemiological data from selected samples collected in three Brazilian macro-regions (Midwest, Southeast, and Northeast), which historically has reported the largest incidences of dengue.<sup>5</sup> In that stage, participants learned how to prepare DNA library and sequencing using the MinION portable sequencer (Oxford Nanopore Technologies). They were also trained on the generation of consensus sequences and genotyping using the Genome Detective tool (<https://www.genomedetective.com/>), on basic topics of epidemiological modeling, and epidemiological maps using R and QGIS software. The second week of the course focused on evolutionary analysis using the genome sequences of DENV1 and DENV2 generated in the previous week. Participants were trained in genomic data preparation, construction of genome dataset from public databases (such as Genbank and ViPR), genome alignment, alignment editing, phylogenetic reconstructions by Maximum Likelihood (ML) approach, in addition to temporal and phylogeographic inference using Bayesian approaches. Participants carried out preliminary epidemiological and evolutionary analyzes for the preparation of this manuscript.

**Date:** August 19-30, 2019

**City:** Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil

**Course hours:** 96 hours (40h of theoretical classes and 56h of practical classes)

## **FUNDING**

Pan American World Health Organization (PAHO/WHO) and Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/Brazilian Ministry of Health.



**ORGANIZERS**

- Luiz Carlos Junior Alcantara, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro Brazil;
- Carlos Frederico Campelo de Albuquerque, Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil;
- André Luiz de Abreu, Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil;
- Rodrigo Fabiano do Carmo Said, Coordenação Geral das Arboviroses, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil;
- Marluce Aparecida Assunção Oliveira, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
- Mauricio Abreu Santos, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
- Maricélia Maia de Lima, Secretaria de Saúde de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;
- Gabriel Muricy Cunha, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;
- Vinicius Lemes da Silva, Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Goiânia, Goiás, Brazil;
- Ana Maria Bispo de Fellipis, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Vasco Azevedo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
- Marta Giovanetti, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

## LECTURERS

### International

- José Lourenço, Department of Zoology, Peter Medawar Building, University of Oxford, Oxford, United Kingdom;
- Tulio de Oliveira, KwaZulu-Natal Research Innovation and Sequencing Platform (KRISP), College of Health Sciences, University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa.

### Brazilian

- Luiz Carlos Junior Alcantara, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Rivaldo Venâncio, Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Ana Maria Bispo de Fellipis, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Rita Maria Ribeiro Nogueira, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Erenilde Marques de Cerqueira, Universidade Estadual de Feira de Santana, Salvador, Bahia, Brazil;
- Wildo Navegantes de Araújo, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil;
- Melissa Barreto Falcão, Secretaria de Saúde de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;
- Renato Barbosa Reis, Universidade Salvador, Salvador, Bahia, Brazil;
- Tiago Graf, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil;
- Marta Giovanetti, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Ingra Morales Claro, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil;

- Jaqueline de Jesus, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil;
- Isadora Cristina de Siqueira, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil;
- Joilson Xavier, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Mariane Talon Menezes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Flavia Cristina da Silva Sales, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil;
- Fernanda de Bruycker Nogueira, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Felipe Campos de Melo Iani, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
- Talita Émile Ribeiro Adelino, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
- Valdinete Alves do Nascimento, Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Amazonas, Brazil;
- Allison de Araújo Fabri, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Flávia Löwen Levy Chalhoub, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Álvaro Salgado de Abreu, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Vagner Fonseca, Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- Francielly Rodrigues da Costa, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;
- Jorlan Fernandes de Jesus, Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

- Maricélia Maia de Lima, Secretária de Saúde de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;
- Victor Pimentel, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal;
- Darlan da Silva Cândido, Department of Zoology, Peter Medawar Building, University of Oxford, Oxford, United Kingdom;
- Flávia Figueira Aburjaile, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;
- Rodrigo Días de Oliveira Carvalho, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscou, Russia.

## STUDENTS

Name	Affiliation	Country
Clara Guerra Duarte	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Maira Alves Pereira	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Paulo Eduardo de Souza da Silva	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Raoni Almeida de Souza	Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Anne Aline Pereira de Paiva	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Hegger Machado Fritsch	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Maria Angélica Mares-Guia	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Maurício Teixeira Lima	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Stephane Fraga de Oliveira Tosta	Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Ronaldo de Jesus	Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil	Brazil
Emerson Luiz Lima de Araújo	Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil	Brazil
Carlos Frederico Campelo de Albuquerque	Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil	Brazil
Alessandra Lima Silva	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Anne Cybelle Pinto	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Arun Kumar Jaiswal	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Élisson Nogueira Lopes	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil

Gabriel Quintanilha-Peixoto	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Paula Luize Camargos Fonseca	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Renan Pedra de Souza	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Sandeep Tiwari	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Wylerson Guimarães Nogueira	Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Beatriz Senra Álvares da Silva Santos	Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Bruna Lopes Bueno	Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Melina Mosquera Navarro Borba	Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil	Brazil
Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, Brasília, Distrito Federal, Brazil	Brazil
Alix Sandra Mazzetto	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil	Brazil
Francisco de Assis Araújo Aguiar	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil	Brazil
Gislene Garcia de Castro Lichs	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil	Brazil
Marina Castilhos Souza Umaki Zardin	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil	Brazil
Irenio da Silva Gomes	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil	Brazil
Jayra Juliana Paiva Alves Abrantes	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil	Brazil
Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral, Recife, Pernambuco, Brazil	Brazil
Ana Flávia Mendonça	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Goiânia, Goiás, Brazil	Brazil
Luiz Augusto Pereira	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Goiânia, Goiás, Brazil	Brazil
Luiz Takao Watanabe	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil	Brazil
Marta Ferreira da Silva Rego	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Muniz, Salvador, Bahia, Brazil	Brazil
Vanessa Brandão Nardy	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Muniz, Salvador, Bahia, Brazil	Brazil
Shirlei Ferreira de Aguiar	Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Fabiana Cristina Pereira dos Santos	Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brazil	Brazil
Alice Louize Nunes Queiroz	Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brazil	Brazil
Bruno Tardelli Diniz Nunes	Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brazil	Brazil
Cynthia Carolina Vazquez	Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, Paraguay	Paraguay
Cintia Marcela Fabbri	Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio Maiztegui,	Argentina

	Pergamino, Argentina	
Alexander Martinez	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama	Panama
Claudia González	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama	Panama
Lisseth Saéz	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama	Panama
María Chen-Germán	Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama, Panama	Panama
Jaime Lagos Barrera	Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile	Chile
José Ernesto Ramírez-González	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Bález, Ciudad de México, Mexico	Mexico
Josefina Campos	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr Carlos G Malbrán, Buenos Aires, Argentina	Argentina
Noelia Morel Faller	Ministerio de Salud Pública de Uruguay, Montevideo, Uruguay	Uruguay
Marta Eugenia Víquez Villalobos	Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza em Nutrición y Salud, Tres Ríos, Costa Rica	Costa Rica
Roberto Kaslin	Instituto Nacional de Investigacion en Salud Publica Dr Leopoldo Izquieta Pérez, Guayaquil, Ecuador	Ecuador
Silvia Paola Salgado Cisneros	Instituto Nacional de Investigacion en Salud Publica Dr Leopoldo Izquieta Pérez, Guayaquil, Ecuador	Ecuador
Carolina Dourado Amaral	Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Danielle Bandeira Costa de Sousa Freire	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil	Brazil
Laura Nogueira Cruz	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, Brazil	Brazil
Daniel Mattos	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Leandro Ferreira Lopes Landeira	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil	Brazil
Ariane Coelho Ferraz	Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Daiane Teixeira de Oliveira	Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil	Brazil
Rafael dos Santos Bezerra	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil	Brazil

## COURSE SCHEDULE

**Day 1 – Monday – August 19, 2019 – Wet laboratories from Fundação Ezequiel Dias (FUNED)**  
**(Coordinator: Ingra Morales)**

**08:00-09:00:** Introduction to Nanopore-based sequencing technology. From sample handling to sequencing PCR. Lecturers: Ingra Morales e Jaqueline de Jesus (theory). Participants splitting into 3 classes of 12 students/class (A, B e C).

**09:00-12:00:** Library preparation:

**Group A:** DENV Library preparation from selected samples for group/class A. Lecturers: Jaqueline de Jesus, Flávia Sales, Valdinete Nascimento, and Flávia Chalhoub. (Theory and practice)

**Group B:** DENV Library preparation from selected samples for group/class B. Lecturers: Ingra Morales, Talita Adelino, Fernanda Nogueira, and Allison Fabri. (Theory and practice)

**Group C:** DENV Library preparation from selected samples for group/class C. Lecturers: Joilson Xavier, Mariane Menezes, Darlan Candido, and Felipe Iani. (Theory and practice)

**12:00-13:00:** Lunch time

**13:00-16:00:** DNA library preparation and sequencing on MinION. Wet lab at FUNED:

**Group A:** DNA library preparation and sequencing on MinION of samples from Group A. Lecturers: Jaqueline de Jesus, Flávia Sales, Valdinete Nascimento, and Flávia Chalhoub. (Theory and practice)

**Group B:** DNA library preparation and sequencing on MinION of samples from Group B. Lecturers: Ingra Morales, Talita Adelino, Fernanda Nogueira, and Allison Fabri. (Theory and practice)

**Turma C:** DNA library preparation and sequencing on MinION of samples from Group C. Lecturers: Joilson Xavier, Mariane Menezes, Darlan Candido, and Felipe Iani. (Theory and practice)

**16:00-16:30:** Coffee Break

**16:30-17:00: Amphitheater at FUNED:** Course presentation (Prof. Luiz Alcantara) and guests (Andre Abreu, Julio Croda, Wanderson Oliveira, Rodrigo Said, Carlos Eduardo Amaral Pereira da Silva, Dario Brock Ramalho, Maurício Santos, Marluce Oliveira, Gabriel Muricy, and Vinicius Silva)

**17:00-17:30: Amphitheater at FUNED:** Presentation of the coordination of the dengue surveillance group/DEVIT/SVS-MS and PAHO/WHO in Brazil. "Panorama and surveillance of dengue in the current outbreak in Brazil". Lecturer: Rodrigo Said

**17:30-18:00: Amphitheater at FUNED:** Historical overview of the dengue epidemic in Brazil. Lecturers: Rita Nogueira (speaker) and Ana de Filippis (moderator)

**18:00-18:30: Amphitheater at FUNED:** Genomic surveillance of arboviruses in Brazil and Paraguay. Lecturer: Luiz Alcantara.

**Day 2 – Tuesday - August 20, 2019 – Computer room  
(Coordinator: Wildo Navegantes)**

**08:00-12:00:** Basic concepts of “R” applied to studies of epidemiological modeling. Lecturers: Álvaro Salgado, Vagner Fonseca, Francielly Rodrigues, and Rodrigo Kato. (Theory)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Basic concepts of “R” applied to studies of epidemiological modeling. Lecturers: Álvaro Salgado, Vagner Fonseca, Francielly Rodrigues, and Rodrigo Kato. (Theory and practice)

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-17:00:** Basic concepts of “R” applied to studies of epidemiological modeling. Lecturers: Álvaro Salgado, Vagner Fonseca, Francielly Rodrigues, and Rodrigo Kato. (Practice)



**Day 3 – Wednesday - August 21, 2019 – Computer room****(Coordinator: Renato Reis)**

**08:00-12:00:** Basic concepts of “R” applied to studies of epidemiological modeling. Lecturers: Álvaro Salgado, Vagner Fonseca, Francielly Rodrigues, and Rodrigo Kato. (Theory)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Basic concepts of “R” applied to studies of epidemiological modeling. Lecturers: Álvaro Salgado, Vagner Fonseca, Francielly Rodrigues, and Rodrigo Kato. (Theory and practice)

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-17:00:** Basic concepts of “R” applied to studies of epidemiological modeling. Lecturers: Álvaro Salgado, Vagner Fonseca, Francielly Rodrigues, and Rodrigo Kato. (Practice)

**Day 4 – Thursday - August 22, 2019 – Computer room****(Coordinator: José Lourenço)**

**08:00-12:00:** Epidemiological modeling to predict outbreaks of arboviral diseases and estimation of epidemiological parameters of outbreaks. Lecturers: José Lourenço. (Theory)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Epidemiological modeling to predict outbreaks of arboviral diseases and estimation of epidemiological parameters of outbreaks. Lecturers: José Lourenço, Erenilde Cerqueira, and Wildo Navegantes. (Theory and practice)

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-17:00:** Epidemiological modeling to predict outbreaks of arboviral diseases and estimation of epidemiological parameters of outbreaks. Lecturers: José Lourenço, Erenilde Cerqueira, and Wildo Navegantes. (Practice)

**Day 5 – Friday - August 23, 2019 – Computer room  
(Coordinators: Wildo Navegantes and Renato Reis)**

**08:00-12:00:** Implementation of epidemiological maps from raw data, using "R" and "QGIS", and calculation of spatial and temporal determinants in arboviral infections. Lecturers: Renato Reis and Wildo Navegantes. (Theory)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Implementation of epidemiological maps from raw data, using "R" and "QGIS", and calculation of spatial and temporal determinants in arboviral infections. Lecturers: Renato Reis, Wildo Navegantes, Isadora de Siqueira, and Maricélia Lima. (Theory and practice)

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-17:00:** Implementation of epidemiological maps from raw data, using "R" and "QGIS", and calculation of spatial and temporal determinants in arboviral infections. Lecturers: Wildo Navegantes, Renato Reis, Isadora de Siqueira, and Maricélia Lima. (Practice)

**Days 6 and 7 – Saturday and Sunday – August 24-25, 2019 – Computer room  
(Coordinator: Luiz Alcantara)**

Generation of consensus sequences from MinION raw data. Lecturers: Vagner Fonseca, Álvaro Salgado, Marta Giovanetti, Ingra Morales, Flávia Aburjaile, and Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. (Practice)

**Day 8 – Monday – August 26, 2019 – Computer room**

**08:00-12:00:** Organization and alignment of genomes to reference sequences, and phylogenetic reconstruction: NJ and ML. Lecturers: Marta Giovanetti, Fernanda Nogueira, Luiz Alcantara, Flávia Aburjaile, and Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. (Theory and practice)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Temporal evolutionary analyzes. Lecturers: Tiago Graf, Marta Giovanetti, Darlan Candido, and Jorlan de Jesus. (Theory and practice)

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-16:30:** Temporal evolutionary analyzes. Lecturers: Tiago Graf, Marta Giovanetti, Victor Pimentel, Jorlan de Jesus, and Flávia Aburjaile. (Practice)

**16:30-17:30:** “Genome Detective”, Viral Metagenomics and Online Viral Genotyping Tools. Lecturers: Vagner Fonseca, Ingra Morales, Marta Giovanetti, Flávia Aburjaile, and Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. (Theory)

**Day 9 – Tuesday – August 27, 2019 – Computer room**

**08:00-12:00:** Phylogeographic analysis. Lecturers: Tiago Graf, Marta Giovanetti, and Fernanda Nogueira. (Theory and practice)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Phylogeographic analysis. Lecturers: Tiago Graf, Marta Giovanetti, and Fernanda Nogueira. (Theory and practice)

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-16:10:** “Genome Detective”, Viral Metagenomics and Online Viral Genotyping Tools. Lecturers: Vagner Fonseca, Ingra Morales, Marta Giovanetti, Flávia Aburjaile, and Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. (Theory)

**16:10-18:00:** Phylogeographic analysis. Lecturers: Tiago Graf, Marta Giovanetti, Darlan Cândido, and Fernanda Nogueira. (Practice)

### **Day 10 – Wednesday – August 28, 2019 – Amphitheater**

**08:00-12:00:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-17:00:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

**17:00-18:00:** Temporal clinical surveillance of dengue in Bahia and Brazil. Lecturers: Melissa Falcão and Rivaldo Venâncio.

### **Day 11 – Thursday – August 29, 2019 – Amphitheater**

**08:00-10:00:** Surveillance of arboviral outbreaks through epidemiological and evolutionary temporal studies: putting the results in the format for a publication. Lecturers: Tulio de Oliveira, Tiago Graf, and Marta Giovanetti. (Theory and practice)

**10:00-12:00:** Surveillance of arboviral outbreaks through epidemiological and evolutionary temporal studies: putting the results in the format for a publication. Lecturers: Tulio de Oliveira, Tiago Graf, and Marta Giovanetti. (Theory and practice)

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-18:00:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

### **Day 12 – Friday – August 30, 2019 – Amphitheater**

**08:00-12:00:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

**12:00-13:30:** Lunch time.

**13:30-15:10:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

**15:10-15:30:** Coffee Break

**15:30-18:00:** Preliminary epidemiological and evolutionary analyzes from the data generated during the course.

## REFERENCES

- 1 Quick, J. *et al.* Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* **530**, 228–232 (2016).
- 2 Quick, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* **12**, 1261–1276 (2017).
- 3 Faria, N.R. *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* **361**, 894–899 (2018).
- 4 Brasil. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. 2020. <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>> (accessed May 20, 2020).
- 5 Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. 2019. <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>> (accessed May 20, 2020).

**APÊNDICE B - Material suplementar do artigo “A Retrospective Overview of Zika Virus Evolution in the Midwest of Brazil”**

**Table S1. Information of the 23 sequenced samples of ZIKV**

Samples_ID	Virus	State	City	Sex	Age	Collection date	CTs	Coverage (%)	Mapped reads	Depth of coverage	Acession numbers
LIB8 BC01 GO10 ZIKV Asian Goiania 2016-04-20	ZIKV	GO	Goiania	F	25	2016-04-20	30	85	67305	3459.4	OL423647
LIB8 BC02 GO14 ZIKV Asian Jatai 2016-04-29	ZIKV	GO	Jatai	F	21	2016-04-29	26	93.1	61196	3392.7	OL423648
LIB8 BC03 GO15 ZIKV Asian Goiania 2016-05-01	ZIKV	GO	Goiania	F	32	2016-05-01	26	92.1	73711	3474.8	OL423649
LIB8 BC04 GO18 ZIKV Asian AparecidadeGoiania JardimdosBuritis 2016-06-02	ZIKV	GO	Aparecida de Goiania	F	39	2016-06-02	28	77.2	109118	6684.2	OL423650
LIB8 BC05 GO19 ZIKV Asian Goianira SolardasPaineiras 2016-07-20	ZIKV	GO	Goianira	M	24	2016-07-20	28	74.1	25155	1441.5	OL423651
LIB8 BC06 GO24 ZIKV Asian Goiania 2016-04-01	ZIKV	GO	Goiania	F	57	2016-04-01	28	70.2	49593	3604	OL423652
LIB8 BC07 GO25 ZIKV Asian Goiania 2016-03-31	ZIKV	GO	Goiania	M	22	2016-03-31	28	82.7	30759	1572.4	OL423653
LIB8 BC08 GO28 ZIKV Asian Goiania 2016-04-25	ZIKV	GO	Goiania	F	45	2016-04-25	25	93.2	72886	3371.9	OL423654
LIB8 BC09 GO30 ZIKV Asian Goiania 2016-02-22	ZIKV	GO	Goiania	M	42	2016-02-22	29	75.5	27154	1636.6	OL423655
LIB8 BC10 GO31 ZIKV Asian Goiania 2016-02-22	ZIKV	GO	Goiania	M	40	2016-02-22	29	82.3	99199	6454.7	OL423656
LIB8 BC11 GO36 ZIKV Asian Inhumas 2017-06-01	ZIKV	GO	Inhumas	F	21	2017-06-01	27	93.1	54484	2568.2	OL423657
LIB8 BC12 GO38 ZIKV Asian AparecidadeGoiania TerraPrometida 2017-11-23	ZIKV	GO	Aparecida de Goiania	M	27	2017-11-23	27	77.2	35410	1743.6	OL423658
LIB8 BC13 GO39 ZIKV Asian AparecidadeGoiania RosadosVentos 2017-12-07	ZIKV	GO	Aparecida de Goiania	F	29	2017-12-07	29.3	82	68937	3992.4	OL423659
LIB8 BC14 GO43 ZIKV Asian AparecidadeGoiania PontalSul2 2017-06-30	ZIKV	GO	Aparecida de Goiania	M	32	2017-06-30	25	93.2	82132	3817.1	OL423660
LIB8 BC15 GO50 ZIKV Asian Goiania 2017-01-02	ZIKV	GO	Goiania	M	45	2017-01-02	28.9	82	30244	1478.7	OL423661

LIB8 BC16 GO52 ZIKV Asian Goiania 2017-01-20	ZIKV	GO	Goiania	M	36	2017-01-20	28	85.4	46106	2232.4	OL42366 2
LIB8 BC17 GO53 ZIKV Asian Goiania JardimPlanalto 2017-02-23	ZIKV	GO	Goiania	M	33	2017-02-23	28	75.7	25615	1477.5	OL42366 3
LIB8 BC18 GO54 ZIKV Asian Goiania JardimPompeia 2017-03-08	ZIKV	GO	Goiania	F	21	2017-03-08	27	93.1	41735	1928.7	OL42366 4
LIB8 BC19 GO56 ZIKV Asian AparecidadeGoiania NovaOlinda 2018-04-18	ZIKV	GO	Aparecida de Goiania	F	20	2018-04-18	30	87.2	56627	2794.7	OL42366 5
LIB8 BC20 GO57 ZIKV Asian AparecidadeGoiania CandidadeQueiroz 2018-01-26	ZIKV	GO	Aparecida de Goiania	F	19	2018-01-26	32	56.1	35274	3047.1	OL42366 6
LIB8 BC21 GO58 ZIKV Asian Goiatuba 2018-03-23	ZIKV	GO	Goiatuba	F	26	2018-03-23	28	87.6	29706	1486.9	OL42366 7
LIB8 BC22 GO59 ZIKV Asian Goiatuba 2018-03-26	ZIKV	GO	Goiatuba	M	26	2018-03-26	27	84.6	55110	2750.1	OL42366 8
LIB8 BC23 GO70 ZIKV Asian Goiania 2017-03-17	ZIKV	GO	Goiania	M	29	2017-03-17	29	75.5	51664	2952.2	OL42366 9



**APÊNDICE C - Outros artigos publicados durante o doutorado**

1. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, Xavier J, Quick J, du Plessis L, Dellicour S, Thézé J, Carvalho RDO, Baele G, Wu CH, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J, Obolski U, Abade L, Vasylyeva TI, Giovanetti M, Yi D, Weiss DJ, Wint GRW, Shearer FM, Funk S, Nikolay B, Fonseca V, **Adelino TER**, Oliveira MAA, Silva MVF, Sacchetto L, Figueiredo PO, Rezende IM, Mello EM, Said RFC, Santos DA, Ferraz ML, Brito MG, Santana LF, Menezes MT, Brindeiro RM, Tanuri A, Dos Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Rocco IM, da Costa AC, Komninakis SCV, Azevedo V, Chieppe AO, Araujo ESM, Mendonça MCL, Dos Santos CC, Dos Santos CD, Mares-Guia AM, Nogueira RMR, Sequeira PC, Abreu RG, Garcia MHO, Abreu AL, Okumoto O, Kroon EG, de Albuquerque CFC, Lewandowski K, Pullan ST, Carroll M, de Oliveira T, Sabino EC, Souza RP, Suchard MA, Lemey P, Trindade GS, Drumond BP, Filippis AMB, Loman NJ, Cauchemez S, Alcantara LCJ, Pybus OG. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018 Aug 31;361(6405):894-899. doi: 10.1126/science.aat7115. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30139911; PMCID: PMC6874500.
2. Rocha MN, Duarte MM, Mansur SB, Silva BDME, Pereira TN, **Adelino TÉR**, Giovanetti M, Alcantara LCJ, Santos FM, Costa VRM, Teixeira MM, Iani FCM, Costa VV, Moreira LA. Pluripotency of *Wolbachia* against Arboviruses: the case of yellow fever. *Gates Open Res*. 2019 Apr 16;3:161. doi: 10.12688/gatesopenres.12903.2. PMID: 31259313; PMCID: PMC6561079.
3. Vilges de Oliveira S, Faccini-Martínez ÁA, **Adelino TER**, de Lima Duré AÍ, Barbieri ARM, Labruna MB. Needlestick-Associated Rocky Mountain Spotted Fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(4):815-816. doi: 10.3201/eid2604.191251. PMID: 32187008; PMCID: PMC7101093.
4. Xavier J, Giovanetti M, **Adelino T**, Fonseca V, Barbosa da Costa AV, Ribeiro AA, Felicio KN, Duarte CG, Ferreira Silva MV, Salgado Á, Lima MT, de Jesus R, Fabri A, Soares Zoboli CF, Souza Santos TG, Iani F, Ciccozzi M, Bispo de Filippis AM,

Teixeira de Siqueira MAM, de Abreu AL, de Azevedo V, Ramalho DB, Campelo de Albuquerque CF, de Oliveira T, Holmes EC, Lourenço J, Junior Alcantara LC, Assunção Oliveira MA. The ongoing COVID-19 epidemic in Minas Gerais, Brazil: insights from epidemiological data and SARS-CoV-2 whole genome sequencing. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):1824-1834. doi: 10.1080/22221751.2020.1803146. PMID: 32726185; PMCID: PMC7473129.

5. Xavier J, Fonseca V, Bezerra JF, do Monte Alves M, Mares-Guia MA, Claro IM, de Jesus R, **Adelino T**, Araújo E, Cavalcante KRLJ, Tosta S, de Souza TR, Moreira da Cruz FE, de Araújo Fabri A, de Oliveira EC, de Moura NFO, do Carmo Said RF, de Albuquerque CFC, Azevedo V, de Oliveira T, de Filippis AMB, Venâncio da Cunha R, Luz KG, Giovanetti M, Alcantara LCJ. Chikungunya virus ECSA lineage reintroduction in the northeasternmost region of Brazil. *Int J Infect Dis.* 2021 Apr;105:120-123. doi: 10.1016/j.ijid.2021.01.026. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33476757.

6. de Oliveira EC, Fonseca V, Xavier J, **Adelino T**, Morales Claro I, Fabri A, Marques Macario E, Viniski AE, Campos Souza CL, Gomes da Costa ES, Soares de Sousa C, Guimarães Dias Duarte F, Correia de Medeiros A, Campelo de Albuquerque CF, Venancio Cunha R, Oliveira De Moura NF, Bispo de Filippis AM, Oliveira T, Lourenço J, de Abreu AL, Alcantara LCJ, Giovanetti M. Short report: Introduction of chikungunya virus ECSA genotype into the Brazilian Midwest and its dispersion through the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 Apr 16;15(4):e0009290. doi: 10.1371/journal.pntd.0009290. PMID: 33861753; PMCID: PMC8051810.

7. Giovanetti M, Alcantara LCJ, Dorea AS, Ferreira QR, Marques WA, Junior Franca de Barros J, **Adelino TER**, Tosta S, Fritsch H, Iani FCM, Mares-Guia MA, Salgado A, Fonseca V, Xavier J, Lopes EN, Soares GC, de Castro Amarante MF, Azevedo V, Kruger A, Correa Matta G, Paineiras-Domingos LL, Colonnello C, Bispo de Filippis AM, Montesano C, Colizzi V, Barreto FK. Promoting Responsible Research and Innovation (RRI) During Brazilian Activities of Genomic and Epidemiological Surveillance of Arboviruses. *Front Public Health.* 2021 Jul 1;9:693743. doi: 10.3389/fpubh.2021.693743. PMID: 34277552; PMCID: PMC8282202.

8. Iani FCM, Giovanetti M, Fonseca V, Souza WM, **Adelino TER**, Xavier J, Jesus JG, Pereira MA, Silva MVF, Costa AVB, Silva EC, Mendes MCO, Filippis AMB, Albuquerque CFC, Abreu AL, Oliveira MAA, Alcantara LCJ, Faria NR. Epidemiology and evolution of Zika virus in Minas Gerais, Southeast Brazil. *Infect Genet Evol.* 2021 Jul;91:104785. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104785. Epub 2021 Feb 27. PMID: 33652117.

9. Fradico JRB, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Coelho-Dos-Reis JGA, Faria ES, Drumond BP, de Rezende IM, Almeida JF, da Silva RB, Gusmão JD, Arcoverde Medeiros EL, Rodrigues RCM, Ribeiro JGL, Pereira MA, Silva MVF, Rocha MLC, **Adelino TER**, de Melo Iani FC, Pereira GC, Fernandes EG, Auxiliadora-Martins M, Valim V, de Souza Gomes M, Amaral LR, Romano APM, Ramos DG, Carvalho SMD, Fantinato FFST, do Carmo Said RF, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. CCL3, CCL5, IL-15, IL-1Ra and VEGF compose a reliable algorithm to discriminate classes of adverse events following 17DD-YF primary vaccination according to cause-specific definitions. *Vaccine.* 2021 Jul 13;39(31):4359-4372. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.05.101. Epub 2021 Jun 16. PMID: 34147295.

10. Fonseca V, de Jesus R, **Adelino T**, Reis AB, de Souza BB, Ribeiro AA, Guimarães NR, Livorati MTFP, Neto DFL, Kato RB, Portela LMO, Dutra LH, Freitas C, de Abreu AL, Filizzola ERM, de Medeiros AC, Iani FCM, Carvalho G, Lourenço J, de Oliveira T, Alcantara LCJ, Giovanetti M. Genomic evidence of SARS-CoV-2 reinfection case with the emerging B.1.2 variant in Brazil. *J Infect.* 2021 Aug;83(2):237-279. doi: 10.1016/j.jinf.2021.05.014. Epub 2021 May 21. PMID: 34029627; PMCID: PMC8139330.

11. Slavov SN, Giovanetti M, Dos Santos Bezerra R, Fonseca V, Santos EV, Rodrigues ES, **Adelino T**, Xavier J, Borges JS, Evaristo M, Lima MT, de Carvalho Pereira G, Yamamoto AY, Clé DV, Calado RT, Covas DT, Alcantara LCJ, Kashima S. Molecular surveillance of the on-going SARS-COV-2 epidemic in Ribeirao Preto City, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2021 Sep;93:104976. doi:

10.1016/j.meegid.2021.104976. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34174479; PMCID: PMC8223017.

12. Meurer IR, Silva MR, Silva MVF, de Lima Duré AÍ, **Adelino TÉR**, da Costa AVB, Vanelli CP, de Paula Souza E Guimarães RJ, Rozental T, de Lemos ERS, Corrêa JODA. Seroprevalence estimate and risk factors for *Coxiella burnetii* infections among humans in a highly urbanised Brazilian state. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2022 Mar 2;116(3):261-269. doi: 10.1093/trstmh/trab113. PMID: 34308483.

13. Giovanetti M, Slavov SN, Fonseca V, Wilkinson E, Tegally H, Patané JSL, Viala VL, San EJ, Rodrigues ES, Santos EV, Aburjaile F, Xavier J, Fritsch H, **Adelino TER**, Pereira F, Leal A, Iani FCM, de Carvalho Pereira G, Vazquez C, Sanabria GME, Oliveira EC, Demarchi L, Croda J, Dos Santos Bezerra R, Paola Oliveira de Lima L, Martins AJ, Renata Dos Santos Barros C, Marqueze EC, de Souza Today Bernardino J, Moretti DB, Brassaloti RA, de Lello Rocha Campos Cassano R, Mariani PDSC, Kitajima JP, Santos B, Proto-Siqueira R, Cantarelli VV, Tosta S, Nardy VB, Reboredo de Oliveira da Silva L, Gómez MKA, Lima JG, Ribeiro AA, Guimarães NR, Watanabe LT, Barbosa Da Silva L, da Silva Ferreira R, da Penha MPF, Ortega MJ, de la Fuente AG, Villalba S, Torales J, Gamarra ML, Aquino C, Figueredo GPM, Fava WS, Motta-Castro ARC, Venturini J, do Vale Leone de Oliveira SM, Gonçalves CCM, do Carmo Debur Rossa M, Becker GN, Giacomini MP, Marques NQ, Riediger IN, Raboni S, Mattoso G, Cataneo AD, Zanluca C, Duarte Dos Santos CN, Assato PA, Allan da Silva da Costa F, Poleti MD, Lesbon JCC, Mattos EC, Banho CA, Sacchetto L, Moraes MM, Grotto RMT, Souza-Neto JA, Nogueira ML, Fukumasu H, Coutinho LL, Calado RT, Neto RM, Bispo de Filippis AM, Venancio da Cunha R, Freitas C, Peterka CRL, de Fátima Rangel Fernandes C, Navegantes W, do Carmo Said RF, Campelo de A E Melo CF, Almiron M, Lourenço J, de Oliveira T, Holmes EC, Haddad R, Sampaio SC, Elias MC, Kashima S, Junior de Alcantara LC, Covas DT. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. *Nat Microbiol.* 2022 Sep;7(9):1490-1500. doi: 10.1038/s41564-022-01191-z. Epub 2022 Aug 18. PMID: 35982313; PMCID: PMC9417986.

14. Fritsch H, Giovanetti M, Xavier J, **Adelino TER**, Fonseca V, de Jesus JG, de Jesus R, Freitas C, Peterka CRL, Campelo de Albuquerque CF, Bispo de Filippis AM, da Cunha RV, Silva EC, Alcantara LCJ, Iani FCM. Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil. *Microbiol Spectr.* 2022 Aug 25:e0128522. doi: 10.1128/spectrum.01285-22. Epub ahead of print. PMID: 36005767.

15. Fonseca PLC, Moreira FRR, de Souza RM, Guimarães NR, Carvalho NO, **Adelino TER**, Alves HJ, Alvim LB, Candido DS, Coelho HP, Costa AVB, Costa WC, de Carvalho AF, de Faria BWF, de Lima AB, de Oliveira ES, de Souza CSA, de Souza FG, Dias RC, Geddes VEV, Godinho IP, Gonçalves AL, Lourenço KL, Magalhães RDM, Malta FSV, Medeiros ELA, Mendes FS, Mendes PHBP, Mendonça CPTB, Menezes AL, Menezes D, Menezes MT, Miguíta L, Moreira RG, Peixoto RB, Queiroz DC, Ribeiro AA, Ribeiro APB, Saliba JW, Sato HI, Silva JDP, Silva NP, Faria NR, Teixeira SMR, da Fonseca FG, Fernandes APSM, Zauli DAG, Januario JN, de Oliveira JS, Iani FCM, de Aguiar RS, de Souza RP. Tracking the turnover of SARS-CoV-2 VOCs Gamma to Delta in a Brazilian state (Minas Gerais) with a high-vaccination status. *Virus Evol.* 2022 Jul 27;8(2):veac064. doi: 10.1093/ve/veac064. PMID: 35996592; PMCID: PMC9384558.