



Universidade De Brasília
Faculdade De Medicina
Programa De Pós-Graduação Em Medicina Tropical

ALICIA CAVALCANTE MAIA

**DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS
VÍRUS DA DENGUE CIRCULANTES NO DISTRITO FEDERAL NAS
EPIDEMIAS DE 2022 E 2024**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

BRASÍLIA, DF

2026

ALICIA CAVALCANTE MAIA

**DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS
VÍRUS DA DENGUE CIRCULANTES NO DISTRITO FEDERAL NAS
EPIDEMIAS DE 2022 E 2024**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

**Coorientador: Prof. Dr. Alex Leite
Pereira**

BRASÍLIA, DF

2026

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cd
Cavalcante Maia, Alicia
DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS
VÍRUS DA DENGUE CIRCULANTES NO DISTRITO FEDERAL NAS
EPIDEMIAS DE 2022 E 2024 / Alicia Cavalcante Maia;
orientador Rodrigo Haddad; co-orientador Alex Leite Pereira.
Brasília, 2026.
127 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) Universidade
de Brasília, 2026.

1. Análise Filogenética. 2. Dengue Virus. 3. Sorotipos.
4. Genótipos. 5. Sequenciamento genômico. I. Haddad,
Rodrigo, orient. II. Leite Pereira, Alex, co-orient. III.
Título.

ALICIA CAVALCANTE MAIA

**DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS
VÍRUS DA DENGUE CIRCULANTES NO DISTRITO FEDERAL NAS
EPIDEMIAS DE 2022 E 2024**

BANCA EXAMINADORA

Presidente/ Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad
(Universidade de Brasília/ NMT)

Coorientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira
(Universidade de Brasília/ NMT)

Dr. Svetoslav Nanev Slavov
(Instituto Butantan)

Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo
(Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Diego Madureira de Oliveira
(Universidade de Brasília/ Suplente)

BRASÍLIA, 2026

À minha família, em especial minha mãe
e minha irmã, pelo apoio incondicional,
incentivo constante e compreensão ao
longo de toda esta caminhada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por tudo que realizou na minha vida durante todos esses anos.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Antônia e Elder, a minha irmã Andreza, e ao meu namorado e parceiro de vida Felipe, que sempre me ensinaram, me apoiaram e acreditaram junto comigo no meu sonho, sem eles eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo amor, paciência e dedicação durante esses anos de graduação.

As minhas amigas/irmãs de vida, Luana, Viviane, Monicky e Cássia, obrigada por me ensinarem o verdadeiro valor de uma amizade, e que nunca devemos desistir dos nossos sonhos, pois nenhum obstáculo é grande o suficiente que não possa ser superado.

Agradeço as amigas Ester e Giovana, obrigada por toda cumplicidade, ajuda, carinho e respeito durante todos esses anos, desde a graduação, vocês se tornaram parte da minha vida e fizeram dela mais importante e feliz.

Gostaria de agradecer também a todos os meus companheiros do Laboratório de Microrganismos da FCTS, que estiveram comigo em tantos momentos, em especial à Lorena e ao Kaio, que sempre me ensinaram e me ajudaram nos experimentos. Obrigada por todos os momentos de descontração, conversas e risadas, vocês com certeza deixaram tudo mais leve.

Por fim, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Haddad e ao meu coorientador Prof. Dr. Alex Pereira, que confiou em mim para realizar esse trabalho, paciência e aprendizado dentro e fora do laboratório. Foi um privilégio!

Agradeço à CAPES pela confiança e suporte ao longo deste percurso acadêmico. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Este apoio foi essencial para o desenvolvimento das atividades de pesquisa e para a produção do conhecimento aqui apresentado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cálculo para preparo do master mix utilizado para amostras de soro.....	34
Tabela 2 - Valores de referência para o cálculo de preparo de mix para reação de RT-PCR.....	36
Tabela 3 - Primers utilizados para o sequenciamento de DENV-1.....	37
Tabela 4 - Primers utilizados para o sequenciamento de DENV-2.....	38
Tabela 5 – Pool de primers A e B utilizados para Dengue 1 e 2.....	39
Tabela 6 - Valores de referência para preparo de mix de reação Multiplex Tiling PCR para DENV-1.....	40
Tabela 7 - Parâmetros de termociclagem da reação Multiplex Tiling PCR para DENV-1.....	40
Tabela 8 - Valores de referência para preparo de mix de reação Multiplex Tiling PCR para DENV-2.....	41
Tabela 9 - Parâmetros de termociclagem da reação Multiplex Tiling PCR para DENV-2.....	42
Tabela 10 - Parâmetros de qualidade do sequenciamento de DENV-1.....	45
Tabela 11 - Parâmetros de qualidade do sequenciamento de DENV-2.....	46
Tabela 12 - Tabela de Resultados de Genotipagem e Análise de Alinhamento Local (BLASTn) para DENV-1.....	48
Tabela 13 - Tabela de Resultados de Genotipagem e Análise de Alinhamento Local (BLASTn) para DENV-2.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização estrutural do vírus Dengue.....	20
Figura 2: Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero <i>Flavivirus</i>	21
Figura 3: Série histórica de casos prováveis, sorotipos e óbitos por dengue, Chikungunya e Zika – Brasil, 1986 a 2024	27
Figura 4: Curva do número de casos prováveis de dengue por SE de início de sintomas no DF, 2023 e 2024	28
Figura 5: Curva do número de casos prováveis de dengue por SE de início de sintomas. DF, 2024 e 2025	29
Figura 6: Mapa visual de <i>amplicons</i> do sequenciamento do DENV-1	37
Figura 7: Mapa visual de <i>amplicons</i> do sequenciamento do DENV-2	38
Figura 8: Posicionamento filogenético de sequências de DENV-1 (<i>locus</i> M-E).	59
Figura 9: Posicionamento filogenético de sequências de DENV-2 (<i>locus</i> E- NS1-NS2)	61

LISTA DE ABREVIações

- ACMR – Ancestral Comum Mais Recente
- ADE – Amplificação/Intensificação Dependente de Anticorpos (do inglês *Antibody-Dependent Enhancement*)
- BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
- BLASTn – *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos
- C – Capsídeo
- cDNA – DNA complementar
- CHIKV – Vírus Chikungunya
- DENV – Vírus da Dengue
- DF – Distrito Federal
- dsDNA – DNA de dupla fita
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato
- E – Envelope
- ER – Retículo Endoplasmático
- FD – Febre de Dengue
- gDNA – DNA genômico
- IBMP – Instituto de Biologia Molecular do Paraná
- iTOL – *Interactive Tree of Life*
- Kb – Quilobases
- LACEN-DF – Laboratório Central do Distrito Federal
- LDM-HUB – Laboratório de Diagnóstico Molecular do Hospital Universitário de Brasília
- M - Membrana
- MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
- ML – Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*)
- mRNA – RNA mensageiro
- MP – Máxima Parcimônia
- NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
- NJ – *Neighbor-Joining*

nm – Nanômetro

NS – Proteína não estrutural

NSG – Sequenciamento de Nova Geração

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – *Open Reading Frame*

prM – Membrana precursora

RdRp – RNA polimerase dependente de RNA

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcriptase reversa

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR – Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real

SE – Semana Epidemiológica

ssRNA – RNA de fita simples

SUS – Sistema Único de Saúde

UBS – Unidade Básica de Saúde

wf-amplicon – *Workflow* para análise de amplicons

ZIKV – Vírus da Zika

µL – Microlitros

ÓRGÃOS FINANCIADORES

O projeto contou com financiamento do MEC/FUB/FM – Ações integradas de pesquisa e serviço para o enfrentamento da pandemia de covid-19 no Distrito Federal (número 23.106.028855/2020–74) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (Processo FAPDF - 00193–00000495/2020–72 e 193-00000751/2021-11).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Dengue	18
1.2. Vírus da Dengue (DENV)	20
1.3. Variabilidade Genética do DENV	22
1.4. Dados Epidemiológicos	26
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4. MÉTODOS	33
4.1. Coleta das Amostras	33
4.1.1. Amostras da Epidemia de 2022	33
4.1.2. Amostras da Epidemia de 2024	33
4.2. Extração do RNA	34
4.3. Determinação do Sorotipo por RT-PCR em Tempo Real	34
4.4. Protocolo de Sequenciamento do Vírus da Dengue	35
4.5. Reação de RT-PCR para Formação de cDNA	35
4.6. Amplificação de Biblioteca de Sequenciamento	36
4.6.1. Primers	36
4.6.1.1. Preparo do Pool de Primers	39
4.6.2. PCR Multiplex TILING	39
4.6.2.1. Dengue 1	39
4.6.2.2. Dengue 2	41
4.7. Purificação e Quantificação da Biblioteca de Sequenciamento ..	42

4.8. Preparo e Carregamento da Biblioteca.....	42
4.9. Análise dos Dados.....	43
4.9.1. Análise Filogenética e Construção do Dendrograma.....	43
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO	70
ANEXO	84
APÊNDICE A – EXEMPLO DOS RESULTADO GERADO PELO EPI2ME	88
APÊNDICE B – BIBLIOTECA DE SEQUÊNCIAS CONSENSUS	89
APÊNDICE C – DADOS DE SEQUENCIAMENTO E GENOTIPAGEM ...	107
ARTICLE	108

RESUMO

A dengue é uma arbovirose de relevância em saúde pública, causada pelo vírus da dengue (DENV), um Flavivírus composto por quatro sorotipos geneticamente distintos. No Brasil, a circulação simultânea de diferentes sorotipos e genótipos contribui para um cenário hiperendêmico, com destaque para o Distrito Federal, que registrou em 2024 a maior epidemia de sua série histórica, associada à mudança no sorotipo predominante. Nesse contexto, a caracterização molecular dos vírus circulantes é fundamental para compreender a dinâmica de transmissão e a evolução viral. Este estudo teve como objetivo geral analisar as relações filogenéticas dos sorotipos de Dengue circulantes nos anos de 2022 e 2024. Foram analisadas amostras clínicas positivas para o vírus da dengue provenientes de epidemias ocorridas no Distrito Federal nos anos de 2022 e 2024, as quais foram submetidas à extração automatizada de RNA e à identificação dos sorotipos por RT-PCR em tempo real, utilizando o kit diagnóstico ZDC Biomol, permitindo a detecção dos sorotipos DENV-1 a DENV-4. As amostras positivas para DENV-1 e DENV-2 foram selecionadas para o sequenciamento genômico parcial. O protocolo incluiu a síntese de cDNA, amplificação por PCR multiplex Tiling com primers específicos organizados em pools, confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose, purificação e quantificação do material amplificado. O sequenciamento foi conduzido na plataforma MinION. A análise do *reads* e a montagem das sequências consenso foram realizadas no software Epi2me. A genotipagem de DENV foi realizada com o Genome Detective, com validação por BLASTn. As análises filogenéticas utilizaram o pipeline NextClade, que posiciona automaticamente as sequências em uma árvore de referência previamente inferida por máxima verossimilhança (IQ-TREE). O posicionamento considerou mutações compartilhadas em sítios informativos, tratando regiões sem cobertura como dados ausentes. Os resultados evidenciaram uma mudança no perfil de circulação dos sorotipos do vírus da dengue no Distrito Federal entre as epidemias de 2022 e 2024. Em 2022, observou-se predominância quase exclusiva do DENV-1 (97,6%),

enquanto em 2024 ocorreu cocirculação com predomínio do DENV-2 (53,7%). As análises filogenéticas posicionaram as sequências de DENV-1 e DENV-2 do Distrito Federal em árvores de referência robustas. As amostras de DENV-1 agruparam-se consistentemente no Genótipo V, sugerindo circulação contínua de linhagens endêmicas já estabelecidas no país, enquanto as de DENV-2 concentraram-se predominantemente no Genótipo II (Cosmopolita). O agrupamento filogenético das amostras de DENV-2 em clados bem definidos, com baixa dispersão genética, é compatível com uma possível introdução recente e disseminação local dessa linhagem. As análises de similaridade nucleotídica para ambos os sorotipos demonstraram proximidade com isolados brasileiros e internacionais. Em conclusão, a caracterização molecular evidenciou mudança no perfil de circulação viral no Distrito Federal entre 2022 e 2024, com predomínio de DENV-2 no período mais recente. Enquanto as amostras de DENV-1 mantiveram-se no Genótipo V, as de DENV-2 foram classificadas como Genótipo II (Cosmopolita). Os achados reforçam o potencial da vigilância genômica para detectar alterações na dinâmica de circulação do DENV.

ABSTRACT

Dengue is an arbovirus disease of public health relevance caused by the dengue virus (DENV), a flavivirus composed of four genetically distinct serotypes. In Brazil, the simultaneous circulation of different serotypes and genotypes contributes to a hyperendemic scenario, particularly in the Federal District, which recorded its largest epidemic in 2024, associated with a change in the predominant serotype. In this context, the molecular characterization of circulating viruses is essential to understand the dynamics of transmission and viral evolution. The overall objective of this study was to analyze the phylogenetic relationships of dengue serotypes circulating in 2022 and 2024. Clinical samples positive for the dengue virus from epidemics that occurred in the Federal District in 2022 and 2024 were analyzed, which underwent automated RNA extraction and serotype identification by real-time RT-PCR using the ZDC Biomol diagnostic kit, allowing the detection of DENV-1 to DENV-4 serotypes. Samples positive for DENV-1 and DENV-2 were selected for partial genomic sequencing. The protocol included cDNA synthesis, multiplex Tiling PCR amplification with specific primers organized in pools, confirmation of amplification by agarose gel electrophoresis, purification, and quantification of the amplified material. Sequencing was conducted on the MinION platform. Read analysis and consensus sequence assembly were performed using Epi2me software. DENV genotyping was performed using Genome Detective, with validation by BLASTn. Phylogenetic analyses used the NextClade pipeline, which automatically positions sequences in a reference tree previously inferred by maximum likelihood (IQ-TREE). The positioning considered shared mutations at informative sites, treating regions without coverage as missing data. The results showed a change in the circulation profile of dengue virus serotypes in the Federal District between the 2022 and 2024 epidemics. In 2022, DENV-1 was almost exclusively predominant (97.6%), while in 2024, there was co-circulation with a predominance of DENV-2 (53.7%). Phylogenetic analyses positioned the DENV-1 and DENV-2 sequences from the Federal District in robust reference

trees. DENV-1 samples were consistently grouped in Genotype V, suggesting continuous circulation of endemic lineages already established in the country, while DENV-2 samples were predominantly concentrated in Genotype II (Cosmopolitan). The phylogenetic grouping of DENV-2 samples into well-defined clades with low genetic dispersion is consistent with a possible recent introduction and local spread of this lineage. Nucleotide similarity analyses for both serotypes demonstrated proximity to Brazilian and international isolates. In conclusion, molecular characterization showed a change in the viral circulation profile in the Federal District between 2022 and 2024, with a predominance of DENV-2 in the most recent period. While DENV-1 samples remained in Genotype V, DENV-2 samples were classified as Genotype II (Cosmopolitan). The findings reinforce the potential of genomic surveillance to detect changes in the circulation dynamics of DENV.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus da dengue (DENV), cujo principal vetor de transmissão é a fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, embora outras espécies do gênero *Aedes* possam transmitir DENV de forma secundária. Trata-se de uma doença endêmica em diversos países tropicais e subtropicais, incluindo regiões da América Latina, África, Ásia e Oceania. A dengue representa um importante problema de saúde pública, oferecendo risco de infecção a cerca de metade da população mundial, distribuída em mais de 100 países, com uma estimativa anual de 100 a 400 milhões de casos (1–3).

Uma vez que um indivíduo é infectado pela picada de um mosquito infectado com DENV, segue-se um período de incubação variando de 3 a 14 dias, com uma média de 4 a 7 dias. A presença do vírus no sangue do paciente pode ser detectada de 2 a 3 dias antes do início da febre com a viremia persistindo por até 6 dias após o início dos sintomas. Indivíduos sintomáticos e assintomáticos podem transmitir o vírus da dengue para mosquitos (4,5).

A dengue é uma condição aguda, que pode ser assintomática, na maioria dos casos, ou sintomática. Os casos sintomáticos geralmente têm início de 4 a 10 dias após a infecção, e as manifestações começam com a fase febril (temperaturas de até 40°C) com duração de 2 a 7 dias e de início abrupto, associada a cefaleia, perda de apetite, mialgias, artralgias, dor retro orbital, náusea, vômito, inchado de glândulas e exantema, que ocorre em aproximadamente 50% dos casos. Os sintomas tendem a melhorar depois de 1 a 2 semanas. Após a fase febril, grande parte dos pacientes se recuperam progressivamente, com melhora do estado geral e retorno do apetite (1,5).

O DENV é um *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, e pode ser classificado em quatro sorotipos distintos (DENV-1 a 4), cada um apresentando propriedades antigênicas únicas, bem como características genômicas distintas. Os sorotipos DENV-1 a DENV-4 exibem diferenciação

genética substancial, visto que análises filogenéticas demonstraram que cada sorotipo pode ser subdividido em múltiplos genótipos (4,6–8).

Esses sorotipos de DENV são responsáveis por causar uma variação da doença que vai desde infecções assintomáticas, sintomáticas leves como febre de dengue (FD), até quadros mais graves da doença, podendo ser fatal (9,10). O diagnóstico preciso e precoce da dengue é crucial para o gerenciamento adequado da doença e prevenção de complicações graves.

A infecção primária por um dos sorotipos DENV confere imunidade homotípica de longo prazo contra esse sorotipo específico, mas oferece apenas proteção temporária contra os outros sorotipos, ou seja, imunidade heterotípica limitada. A proteção cruzada breve entre sorotipos de dengue é causada pela similaridade genômica (cerca de 70% entre alguns sorotipos), que resulta na presença de epítomos conservados nas proteínas estruturais, como a proteína do envelope (E), que induzem uma resposta imune parcial e transitória contra infecções heterólogas, conferindo imunidade limitada (11–14).

Contudo, apesar da existência de epítomos compartilhados, as divergências genéticas presentes entre os sorotipos resultam na produção de anticorpos que, embora capazes de reconhecer epítomos conservados, são decrescentes e/ou fracamente neutralizantes. No caso de uma reinfecção heteróloga de DENV, esses anticorpos podem contribuir para uma piora do quadro clínico, com a evolução para formas graves da doença através da intensificação dependente de anticorpos (ADE, do inglês *Antibody-Dependent Enhancement*), uma vez que os anticorpos não neutralizantes da infecção primária facilitam a entrada do DENV em células imunes hospedeiras, ampliando a replicação viral (4,6,8,10–15).

A primeira epidemia de dengue no Brasil ocorreu em Boa Vista, Roraima, em 1981. Desde então, epidemias foram registradas em diversas regiões do país. Por muitos anos, a dengue foi a arbovirose predominante no Brasil, até que em 2014 surgiram os primeiros casos de Chikungunya (CHIKV) e, em 2015, os casos de Zika (ZIKV), (16) e mais recentemente, entre 2023 e 2024, se observou o aumento de casos do Oropouche vírus (OROV) (17).

1.2. Vírus da Dengue (DENV)

O DENV é um vírus esférico envelopado, com 40 a 50 nm de diâmetro (Figura 1) (18). A organização genômica do vírus da dengue é composta por um único filamento de ácido ribonucleico de sentido positivo (+ssRNA) com uma extremidade 3' terminal não-poliadenilada. O genoma tem cerca de 11 Kb e possui uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) que é traduzida em uma única poliproteína viral (4,6,10,19).

Associados ao genoma encontram-se a RNA helicase e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), sendo esta última usada para sintetizar as sequências reversas complementares (-ssRNA) que servirão de moldes para novas fitas +ssRNA do vírus. Além dos genes envolvidos na replicação, a região codificadora dos flavivírus possui três genes estruturais que codificam três proteínas virais estruturais, capsídeo (C), membrana precursora (prM) e envelope (E), e sete não estruturais (proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 2) (6,10,19–21).

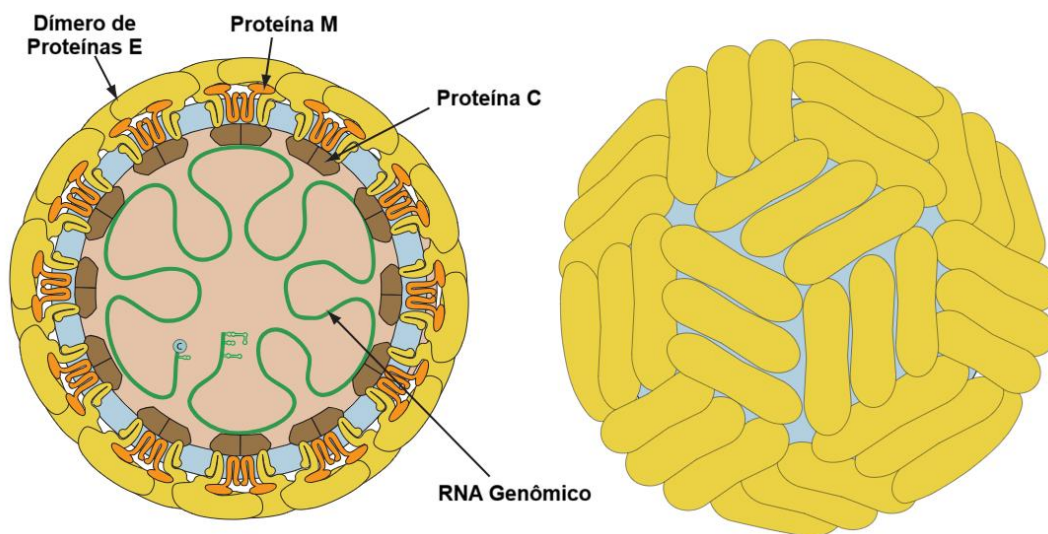


Figura 1: Organização estrutural do vírus Dengue. Proteínas E (Envelope), M (Membrana), C (Capsídeo) contendo em seu interior o RNA (Genoma viral). Fonte: <https://viralzone.expasy.org/24> (Adaptado).

As proteínas estruturais são essenciais para a formação do envelope viral, sendo a estrutura da proteína E especialmente importante, pois está envolvida na mediação da fusão das membranas durante a entrada do vírus nas células hospedeiras (22). Além disso, o complexo formado pelas

proteínas não estruturais é vital para a replicação viral, montagem do vírus no citoplasma e evasão imunológica (20,21). A proteína NS1 envolvido no processo de replicação e desempenha um papel na evasão do sistema imunológico, modulando a resposta imune inata (23). As proteínas NS2A e NS4A são essenciais para a montagem da membrana e para o arcabouço necessário para a síntese do RNA viral (24,25). A proteína NS4B modula as vias de sinalização do hospedeiro e está implicado na patogênese viral (26).

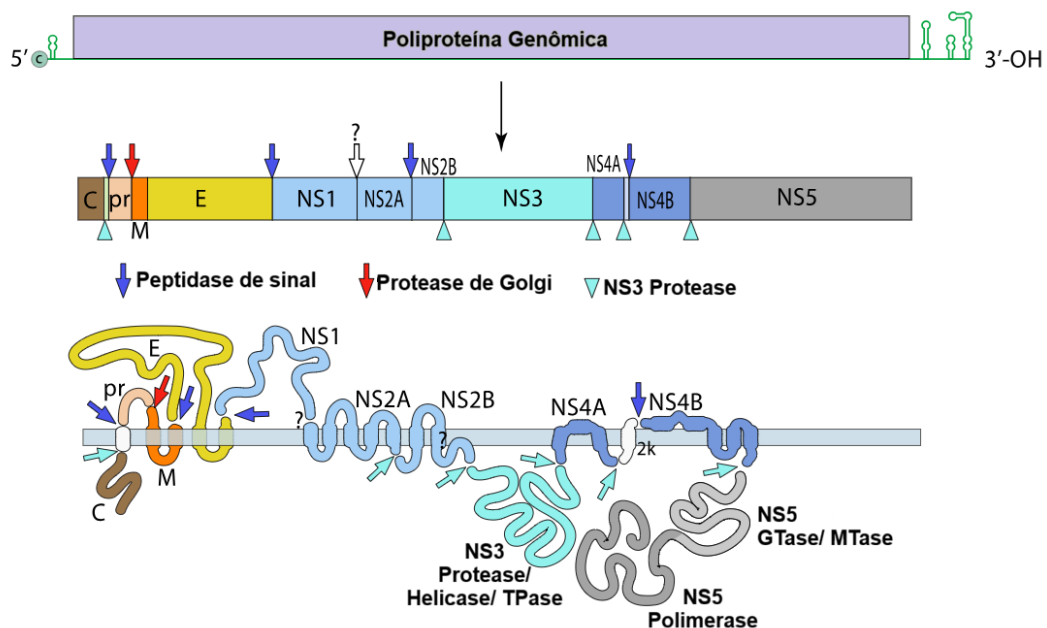


Figura 2: Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Tradução de uma única poliproteína, que é posteriormente clivada por proteases virais e celulares. Fonte: <https://viralzone.expasy.org/24> (Adaptado).

A poliproteína do vírus da dengue é um propeptídeo, um precursor inativo traduzido a partir do RNA mensageiro (mRNA) que contém todas as proteínas virais em uma única cadeia (27). Para se tornarem funcionais, as proteínas são liberadas por meio de clivagens proteolíticas, processo que é mediado por enzimas específicas presentes no vírus: a proteína NS2B atua como cofator para a protease NS3, essencial para o processamento da poliproteína (27); NS3 contém atividades de serina protease, helicase e RNA trifosfatase (28,29); NS5 é a RdRp e tem atividade de metiltransferase, e está associada à evasão imunológica (30,31). O vírus da dengue ainda expressa duas peptidases, a NS2B-NS3pro e a NS3-NS5, que são responsáveis pela

clivagem do polipeptídeo viral em proteínas funcionais (10,27,32). As interações entre NS3 e NS5 são cruciais para o estabelecimento do complexo de replicação viral (33).

A replicação dos flavivírus, como o DENV, ocorre no citoplasma das células hospedeiras dentro do retículo endoplasmático (ER) modificadas em pacotes vesiculares. A montagem das partículas virais ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER), onde adquirem suas membranas e amadurecem durante a passagem pelo sistema secretor do hospedeiro, com clivagem de prM para membrana (M). Vírions podem ser liberados com uma mistura de proteínas M/prM maduras e imaturas. Os flavivírus são caracterizados por sua relação antigênica e exibem vários graus de reatividade cruzada em testes sorológicos (10,30,34).

1.3. Variabilidade Genética do DENV

As relações genéticas entre esses sorotipos de DENV indicam uma linhagem compartilhada com um ancestral comum mais recente (ACMR) estimado em aproximadamente 1115 anos atrás (35). Esses sorotipos demonstram cerca de 70% de similaridade genômica, indicando divergência substancial ao longo do tempo (6,12,14,36). Essa complexidade genética tem implicações para o desenvolvimento de vacinas e para as interações epidemiológicas entre os diferentes sorotipos.

A diferenciação genética entre os sorotipos do vírus da dengue (DENV-1 a DENV-4) é marcada por divergências nucleotídicas superiores a 25%, concentradas principalmente nos genes que codificam as proteínas estruturais do envelope e prM, as quais determinam a especificidade antigênica e a capacidade de infecção (37). Tais diferenças são detectadas por meio de técnicas avançadas de diagnóstico molecular e sequenciamento completo do genoma, possibilitando não apenas a distinção entre os quatro sorotipos, mas também a identificação das linhagens e genótipos existentes dentro de cada um deles, evidenciando uma complexa diversificação evolutiva (38,39).

Entre os diferentes sorotipos do vírus da dengue, cada um apresenta subtipos ou genótipos geneticamente distintos, sendo o DENV-1 classificado em cinco genótipos (I, II, III, IV e V), o DENV-2 em seis genótipos (asiático I, asiático II, asiático/americano, cosmopolita, americano e silvático), o DENV-3 em cinco genótipos (I, II, III, IV e V) e o DENV-4 em quatro genótipos (I, II, III e IV) (6,10,40,41). A classificação genotípica é fundamental para o estabelecimento de relações filogenéticas e para a compreensão da dinâmica de transmissão, introdução e dispersão viral durante os surtos de dengue.

No contexto do DENV-1, diferentes genótipos têm sido associados a padrões distintos de disseminação e impacto epidemiológico. O genótipo I, inicialmente isolado na Malásia em 1968, apresenta ampla circulação no Sudeste Asiático e em partes da América do Sul, enquanto o genótipo II é menos frequente e restrito principalmente a regiões da Ásia e do Pacífico (42–44). O genótipo III tem sido amplamente detectado em epidemias na Ásia e na América do Sul, incluindo o Brasil, evidenciando elevada capacidade adaptativa (45,46). O genótipo IV está frequentemente associado a surtos em regiões do Pacífico, como a Micronésia, enquanto o genótipo V tem se destacado nos surtos mais recentes das Américas, especialmente no Brasil e na Colômbia, sendo associado à rápida expansão e ao aumento do impacto epidemiológico da doença (47–51).

De forma semelhante, o DENV-2 destaca-se por sua expressiva variabilidade genética e por estar frequentemente associado a epidemias de maior gravidade. O genótipo Asiático/Americano tem sido amplamente implicado em grandes epidemias nas Américas e na Ásia, com evidências do surgimento de novas linhagens associadas ao aumento da gravidade clínica e da mortalidade, particularmente na América do Sul (37,52). Os genótipos Asiático I e Asiático II circulam predominantemente no Sudeste Asiático, sendo o primeiro caracterizado por elevada capacidade adaptativa, enquanto o segundo apresenta distribuição mais restrita e menor associação com quadros severos (37,53–55). O genótipo Cosmopolita apresenta ampla distribuição geográfica, incluindo regiões da Europa, Ásia e América do Sul, com elevada diversidade genética que impacta diretamente a magnitude e a

severidade das epidemias (37,54,56). O genótipo Americano permanece relevante para a compreensão histórica da evolução do DENV-2 nas Américas, enquanto o genótipo Silvático, embora raramente associado a surtos humanos, representa um potencial reservatório viral e uma possível fonte de introdução em áreas previamente não endêmicas (56,57).

A dinâmica evolutiva do DENV está diretamente relacionada à sua diversidade genética, refletindo padrões históricos de transmissão e adaptação viral. As taxas estimadas de substituição de nucleotídeos variam entre os genótipos, com o DENV-2 apresentando valores entre 10^{-4} a 10^{-3} substituições por sítio por ano (56). Essa variabilidade genética influencia o comportamento epidemiológico do vírus, incluindo sua interação com o hospedeiro humano e o vetor mosquito, além de impactar a ligação de anticorpos e a eficácia da neutralização imunológica, o que sugere respostas imunes específicas para diferentes genótipos (58–60).

A distribuição geográfica dos genótipos do DENV constitui um fator determinante da epidemiologia da dengue. O genótipo Cosmopolita do DENV-2, por exemplo, apresenta ampla distribuição global e tem substituído linhagens mais antigas em diversas regiões das Américas e da Ásia, contribuindo para a hiperendemicidade observada em algumas áreas devido à circulação simultânea de múltiplos genótipos (61,62). Esse cenário favorece a ocorrência de diferentes padrões epidemiológicos e aumenta o risco de formas graves da doença, especialmente em contextos em que múltiplos sorotipos e genótipos circulam concomitantemente (63,64). Ademais, os agrupamentos genéticos do DENV estão associados a fatores ecológicos e epidemiológicos específicos, influenciando a eficiência de transmissão entre populações locais de mosquitos do gênero *Aedes* (65).

No Brasil, entre 2018 e 2024, observou-se uma flutuação expressiva nos casos de dengue correlacionada à atividade dos sorotipos circulantes, configurando um cenário hiperendêmico. Nesse período, os sorotipos DENV-1 e DENV-2 foram frequentemente associados a casos graves, ao mesmo tempo em que se registrou o ressurgimento do DENV-3, especialmente com o surgimento de novas linhagens (66–68). Destaca-se que o DENV-2,

particularmente o genótipo Cosmopolita, tem sido predominante em surtos recentes, contribuindo de forma significativa para eventos epidêmicos de grande magnitude no país (68,69).

No Distrito Federal, a vigilância epidemiológica e molecular tem documentado a cocirculação de diferentes sorotipos do vírus da dengue. Ao longo de 2023, observou-se atividade expressiva dos sorotipos DENV-1 e DENV-2, sendo este último geneticamente caracterizado em múltiplos clados, o que evidencia sua contínua evolução e capacidade adaptativa no cenário local (67,68). A caracterização molecular confirmou ainda a presença de diferentes genótipos circulantes, indicando uma alteração no padrão histórico de circulação viral, com sinais de transição para maior participação do DENV-3. Esse cenário estabelece bases para desafios epidemiológicos futuros no Distrito Federal, especialmente no que se refere ao potencial aumento da gravidade dos casos (70).

O conhecimento dos sorotipos e genótipos circulantes do vírus dengue, através da análise do genoma viral, pode ajudar a determinar a origem dos vírus isolados, traçar suas vias de introdução e deslocamento dentro de uma região e identificar sua procedência geográfica. Essas informações servem como marcadores epidemiológicos precoces para a implementação de medidas de controle pelas autoridades e para avaliar se os genótipos circulantes estão associados a um maior risco de desenvolvimento de formas graves da doença (40).

A vigilância genômica do vírus da dengue tem evoluído de forma significativa nas últimas décadas, acompanhando o avanço das tecnologias de sequenciamento e a crescente complexidade epidemiológica da doença. Estudos pioneiros realizados a partir da década de 90 utilizaram o sequenciamento de fragmentos do RNA viral, especialmente de regiões codificadoras como o gene do envelope, para identificar subtipos e genótipos dentro de um mesmo sorotipo, evidenciando a evolução molecular do DENV e sua associação com diferenças na virulência e no impacto clínico (41,71,72). Esses avanços permitiram o estabelecimento de relações filogenéticas entre amostras virais, contribuindo para a compreensão das rotas de introdução,

dispersão e persistência de linhagens ao longo do tempo, além de revelar a circulação silenciosa de variantes antes da detecção de surtos clínicos (73–75).

Com a incorporação das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), a vigilância genômica passou a oferecer uma análise mais abrangente e detalhada do genoma viral, possibilitando estudos filodinâmicos e filogeográficos em larga escala. Plataformas de alto rendimento permitiram a geração de genomas completos ou quase completos, ampliando a capacidade de monitorar eventos de substituição genotípica, emergência de novas linhagens e padrões de transmissão viral (74,76). Nesse contexto, o sequenciamento portátil por nanoporos, como a plataforma MinION desenvolvida pela Oxford Nanopore Technologies, representou um marco ao viabilizar o sequenciamento em tempo real e em ambientes descentralizados, tornando-se especialmente valioso para estudos de campo, vigilância epidemiológica genômica e investigação de variantes genéticas do DENV em diferentes regiões do Brasil e do mundo (77–79). A integração dessas tecnologias com ferramentas bioinformáticas e dados epidemiológicos consolidou a vigilância genômica como um componente essencial para a compreensão da dinâmica evolutiva do DENV e para o fortalecimento das estratégias de monitoramento, prevenção e controle da dengue (80).

1.4. Dados Epidemiológicos

A incidência global de casos de dengue apresentou crescimento expressivo nos últimos anos, com mais de 11 milhões de casos suspeitos notificados entre janeiro e agosto de 2024, o que representa um aumento de 233% em relação ao mesmo período de 2023 e de 416% quando comparado à média dos últimos cinco anos. Nesse cenário, o Brasil destaca-se como um dos países com o maior número de casos suspeitos notificados, sendo considerado uma das principais áreas de ocorrência da dengue (1,3).

Em relação à prevalência, o DENV-2 foi o sorotipo de maior presença nas Américas durante vários surtos, classificado epidemiologicamente como

o mais significativo em todo o mundo, seguido por DENV-3, DENV-1 e DENV-4 (81,82).

Em 2022, foram registrados no Brasil 1.450.270 casos prováveis de dengue, correspondendo a uma taxa de incidência de 679,9 casos por 100 mil habitantes (Figura 3). Esse número representa uma redução de 6,2% em relação a 2019; entretanto, quando comparado a 2021, observa-se um aumento expressivo de 162,5% (83). Já em 2024, no período de 31/12/2023 a 29/06/2024, foram notificados 6.215.201 casos prováveis de dengue no país, com coeficiente de incidência de 3.060,7 casos por 100 mil habitantes. Esse quantitativo corresponde a um aumento de 344,5% em relação ao mesmo período do ano anterior, que registrou 1.398.318 casos prováveis e incidência de 688,6 casos por 100 mil habitantes (84).

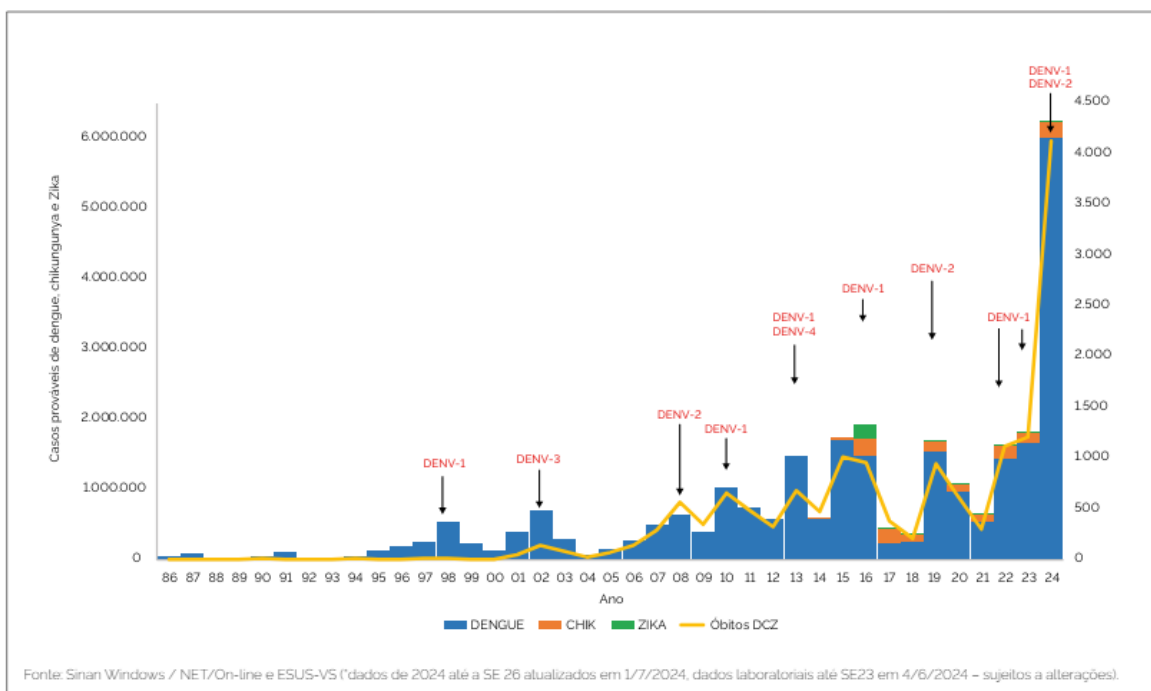
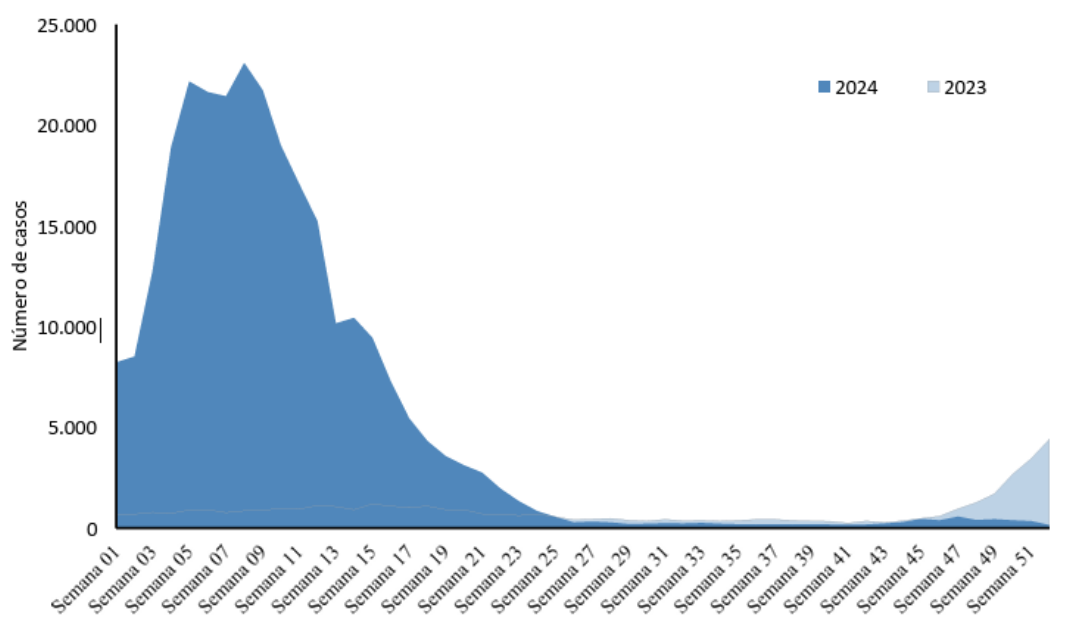


Figura 3: Série histórica de casos prováveis, sorotipos e óbitos por dengue, Chikungunya e Zika – Brasil, 1986 a 2024. Fonte: Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico – Monitoramento das arboviroses 2024.

A nível regional, o Distrito Federal, no ano de 2022, foram registrados 69.645 casos prováveis de dengue, o que representa um acréscimo de 312,4% no número de casos prováveis da doença em comparação com o mesmo período de 2021, sendo o DENV-1 o sorotipo em circulação. A dengue

possui um comportamento sazonal no DF ocorrendo, principalmente, entre os meses de outubro a maio (85). Na Figura 4 é possível avaliar a curva de casos prováveis de dengue por semana epidemiológica (SE) no ano de 2023 e até a SE 52 de 2024 no DF (86). O Distrito Federal, no ano de 2023, foram notificados 40.934 casos prováveis de dengue, uma redução de 45,4% no número de casos prováveis de dengue se comparado ao mesmo período de 2022 (87).

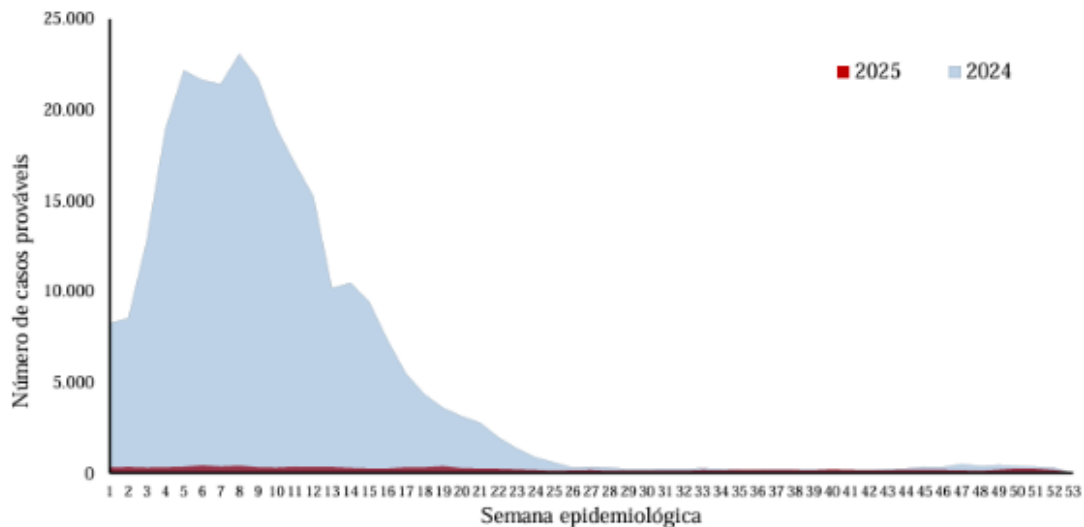


Fonte: SINAN Online. Dados extraídos em 30/12/2024 às 10:41, sujeitos a alterações.

Figura 4: Curva do número de casos prováveis de dengue por SE de início de sintomas no DF, 2023 e 2024. Fonte: Secretária de Saúde do Distrito Federal, Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya, doença aguda pelo vírus Zika e febre amarela até a Semana Epidemiológica 52 de 2024, no Distrito Federal.

No DF no período de 31/12/2023 a 20/07/2024, foram notificados 310.144 casos suspeitos de dengue, dos quais 279.242 eram prováveis. Isso representa um aumento de mais de 1000% se comparado com o mesmo período do ano anterior. O ano de 2024 registrou a maior epidemia de dengue dos últimos anos, sendo observada uma predominância do sorotipo 2, enquanto na epidemia que ocorreu no ano de 2023, foi o sorotipo 1 (88). Em todo o ano de 2025 foram notificados cerca de 25 mil casos suspeitos de dengue no DF dos quais 12.082 eram prováveis, uma redução de aproximadamente 96% no número de casos prováveis de dengue em

residentes no DF se comparado ao mesmo período de 2024, conforme observado na Figura 5 (89).



Fonte: SINAN Online, 05/01/2026.

Figura 5: Curva do número de casos prováveis de dengue por SE de início de sintomas no DF, 2024 e 2025. Fonte: Secretária de Saúde do Distrito Federal, Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica 53 de 2025 no Distrito Federal

A contínua evolução dos genótipos do vírus da dengue no Brasil evidencia a necessidade de estruturas robustas de epidemiologia molecular integradas aos sistemas de vigilância em saúde. A compreensão das mutações genéticas e de suas implicações epidemiológicas permite rastrear rotas de introdução e disseminação viral durante epidemias, além de subsidiar a antecipação de surtos futuros. A interação entre forças evolutivas, como a seleção natural, a diversidade imunológica da população e as mudanças ambientais, acrescenta complexidade à dinâmica de transmissão do DENV. Nesse contexto, a diversidade genética dos sorotipos do vírus da dengue exerce impacto direto tanto sobre a patogênese da doença quanto sobre os padrões epidemiológicos observados, especialmente em regiões como o Brasil, onde múltiplos fatores favorecem a ocorrência recorrente de epidemias.

Portanto, considerando a relevância global e local da dengue, sua complexa dinâmica viral, marcada pela circulação simultânea de múltiplos

sorotipos e genótipos com diferentes implicações epidemiológicas e clínicas, e a observação de flutuações e picos epidêmicos significativos, como o registrado no Distrito Federal em 2024, torna-se imperativa a vigilância genômica contínua. Diante disso, a caracterização molecular de amostras do vírus dengue circulantes no Distrito Federal, visa identificar os sorotipos e genótipos predominantes e contribuir para a compreensão da dinâmica de transmissão e evolução viral na região, dados essenciais para o aprimoramento das estratégias de controle e enfrentamento dessa arbovirose.

2. JUSTIFICATIVA

A análise filogenética do vírus da dengue durante as epidemias de 2022 e 2024 no Distrito Federal é essencial para aprimorar a compreensão da doença. Esse estudo permite rastrear a evolução das linhagens virais, identificando variações genéticas do vírus presentes durante os surtos, o que ajuda a entender como o vírus evolui e se adapta ao longo do tempo. Compreender essas mudanças genéticas pode revelar informações sobre a virulência e o potencial de transmissão dos diferentes sorotipos e genótipos, oferecendo *insights* importantes sobre o impacto das epidemias na saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Detectar sorotipos e analisar as relações filogenéticas de DENV em amostras clínicas coletadas nos anos de 2022 e 2024.

3.2. Objetivos Específicos

- Detectar os sorotipos de dengue por RT-PCR em tempo real;
- Amplificar e realizar o sequenciamento dos vírus da dengue identificados no Distrito Federal no período estudado utilizando a plataforma de sequenciamento MinION (Oxford Nanopore®);
- Realizar a análise filogenética dos sorotipos circulantes
- Comparar os sorotipos circulantes nas epidemias de 2022 e 2024.

4. MÉTODOS

4.1. Coleta das Amostras

4.1.1. Amostras da Epidemia de 2022

As amostras da epidemia de 2022 foram coletadas de usuários do SUS residentes na Região Administrativa XXV SCIA/Estrutural, que buscaram atendimento em saúde na UBS Vila Estrutural com manifestação febril aguda ou com referência a quadro febril agudo nos três dias anteriores, acompanhado por, pelo menos dois dos sinais/sintomas relacionados a infecções virais (por exemplo: dor de cabeça, mialgia, astenia, vômito, náuseas, diarreia, artralgia, entre outros). As amostras foram coletadas após apresentação do Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE) e seu aceite pelos pacientes. Destaca-se que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos, sob número C.A.A.E 39866620.4.0000.5558.

Após as coletas, as amostras foram encaminhadas, em temperatura controlada, para o Laboratório de Diagnóstico Molecular do Hospital Universitário de Brasília (LDM-HUB), e lá, foram extraídas amostras de RNA viral e em seguida, armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.1.2. Amostras da Epidemia de 2024

As amostras da epidemia de 2024, foram obtidas diretamente com o Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), que disponibilizou um conjunto randomizado de amostras positivas para dengue que foram utilizadas para fins diagnóstico. As amostras foram encaminhadas, em temperatura controlada, para o LDM-HUB, e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.2. Extração do RNA

Para a extração do RNA viral, foi utilizado o kit Extracta® Kit Fast - DNA e RNA viral (MVXA-P016 FAST Loccus™), e a plataforma de extração automatizada EXTRACTA® 32 (Loccus™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento dos ensaios para determinação de sorotipos e realização do protocolo para o sequenciamento do genoma viral.

4.3. Determinação do Sorotipo por RT-PCR em Tempo Real

Após extração do RNA viral, foram realizados os ensaios para a detecção do sorotipo do vírus dengue (sorotipos 1,2,3 e 4), por meio de Reação em Cadeia de Polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR em tempo real). Para o teste utilizou-se o kit ZDC Biomol (Zika, Dengue e Chikungunya), desenvolvido pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), seguindo as instruções do fabricante.

O volume final da reação foi de 20 µL, os quais eram 10,5 µL do master mix preparado e 9,5 µL do RNA extraído da amostra. O mix foi preparado adicionando os seguintes reagentes: Mix para PCR, conjunto de iniciadores específicos, conjunto de sondas específicas, enzima transcriptase reversa e água *RNAse free*, conforme descrito na Tabela 1. Os volumes dos reagentes foram ajustados de acordo com o número de reações realizadas. As reações foram conduzidas em placas de PCR de 96 poços, organizadas separadamente para cada alvo analisado, incluindo dois poços destinados aos controles positivo e negativo.

Tabela 1 - Cálculo para preparo do master mix utilizado para amostras de soro

Reagentes	1 reação (µL)	96 reações (µL)
Mistura PCR	6,66	639,36
Iniciadores	2	192
Sonda	1	96
Enzima RT	0,5	48
Água <i>RNAse free</i>	0,34	32,64

Nota: Foi necessário adaptar o valor utilizado de água *RNAse free* para que se pudesse utilizar um volume maior de amostra, sem que houvesse prejuízo na reação.

Fonte: Instruções de uso – KIT BIOMOL ZDC.

Foi utilizada a plataforma de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems®) para a execução dos testes, seguindo as recomendações de composição da reação e ciclagem recomendadas no kit diagnóstico citado (ZDC Biomol).

4.4. Protocolo de Sequenciamento do Vírus da Dengue

O protocolo para o sequenciamento foi realizado nas seguintes etapas: Reação de transcriptase reversa (RT); Amplificação da região genômica de interesse por Multiplex Tiling PCR; Purificação e quantificação da biblioteca; Preparo da biblioteca, seguindo o protocolo específico para a plataforma MinION; Carregamento da biblioteca na plataforma MinION.

4.5. Reação de RT-PCR para Formação de cDNA

Previamente à reação de RT-PCR (Reação de Polimerase em cadeia com Transcriptase Reversa), foi feita a desnaturação do RNA na presença de *Random Primers* (Promega®) ou dos primers específicos para o sequenciamento. A reação de desnaturação (65°C por 5 minutos e imediato acondicionamento em gelo) foi feita utilizando 6µL do RNA extraído das amostras e 1µL de *random primers*, para dengue 1, ou pool de primers específicos para dengue 2, ambos diluídos 1:2 com água *RNAse free*.

O mix para a reação de RT-PCR foi feito com base nas recomendações do kit M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus (Promega®), e contou com os seguintes reagentes: MLV-RT 5X Buffer (Promega®); Mix de dNTP *Solution* (Amersham™ Cytiva) preparado previamente e a uma concentração de 10mM de cada; Enzima MLV-RT (Promega®); e água *RNAse free*.

O volume final de reação foi de 20µL, com a proporção de amostra e reagentes descrita na Tabela 2. Foi utilizado o termociclador 2720 Thermal Cycler™ (Applied Biosystems®), onde as amostras foram aquecidas a seguindo a programação de ciclagem descrito adiante: 25°C por 5 minutos, 50°C por 50 minutos e 80°C por 10 minutos. As reações foram armazenadas em geladeira com temperaturas variando de 3 a 8°C.

Tabela 2 - Valores de referência para o cálculo de preparo de mix para reação de RT-PCR

Reagentes	Volume (µL) à 1 Reação
MLV-RT 5X Buffer	4
dntp [10mM cada]	1
MLV-RT Enzima	1
Água <i>RNAse free</i>	7
RNA	7
Total	20

Fonte: Informações de uso – Kit M-MLV Reverse Transcriptase, RNAse H Minus (Promega®).

4.6. Amplificação de Biblioteca de Sequenciamento

4.6.1. Primers

Os primers utilizados para o sequenciamento foram sintetizados pela empresa Exxtend, e as sequências utilizadas vieram do conjunto de primers específicos projetados pelo projeto CADDE (Centro Brasil-Reino Unido para Descoberta, Diagnóstico, Genômica e Epidemiologia (Arbo)vírus) para o sequenciamento dos genomas completos de DENV. Para o sequenciamento parcial do genoma de DENV foram selecionados primers para amplificação do locus genômico de posição 134::4241 de DENV-1 (RefSeq NC_001477) e de posição 85::4420 de DENV-2 (RefSeq NC_001474.2).

Para fazer a análise de identidade dos primers com a sequência de referência, foi utilizado a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) hospedada no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A ferramenta BLASTn encontra regiões de similaridade local entre sequências biológicas (81). Os primers utilizados e a sequência de cada um estão descritos nas Tabelas 3 e 4, para dengue 1 e 2, respectivamente.

A divisão do conjunto de primers em pools se dá devido a utilização da técnica Multiplex Tiling PCR, uma variação da reação em cadeia da polimerase (PCR) que utiliza múltiplos pares de primers para a criação de amplicons sobrepostos com o objetivo de cobrirem toda a região genômica de

interesse. O mapa visual dos primers estão nas Figuras 6 e 7, para dengue 1 e 2, respectivamente.

Tabela 3 - Primers utilizados para o sequenciamento de DENV-1

Primer	Sequência (5'-3')	Posição inicial*	Posição Final*	Identidade
DENV1_1_LEFT	AATATGCTGAAACGCGCGAGAA	134	155	100%
DENV1_1_RIGHT	CCGTCTTCAAGAGTTCAATGTCCA	1056	1079	100%
DENV1_2_LEFT	ACCCAGGATTCACGGTGATAGC	825	846	100%
DENV1_2_RIGHT	ACCAGCAA A TCTTGTCT G TTCCA	1625	1647	91%
DENV1_3_LEFT	GGAAATACAGCTGAC C GACTACG	1447	1469	96%
DENV1_3_RIGHT	ACTGC A AT G CACGTCAT C GAAA	2358	2379	91%
DENV1_4_LEFT	CAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGA	2110	2132	100%
DENV1_4_RIGHT	TTGATGGCAGCTGACATTAGCC	2964	2985	100%
DENV1_5_LEFT	TGGAACATTTGGGAAGTTGA G GAC	2867	2890	96%
DENV1_5_RIGHT	ACTTCTCT G GATGTTA G TCTGCG	3755	3777	91%
DENV1_6_LEFT	TGGATGAACATTGTGGAAATCGAGG	3279	3303	100%
DENV1_6_RIGHT	GCATGCCTCCAGCTATTAGTGG	4220	4241	100%

* De acordo com a Sequência de Referência no NCBI: NC_001477.1

Nota: Em vermelho são os nucleotídeos que não apresentam identidade com a sequência de referência.

Fonte: Autoria Própria.

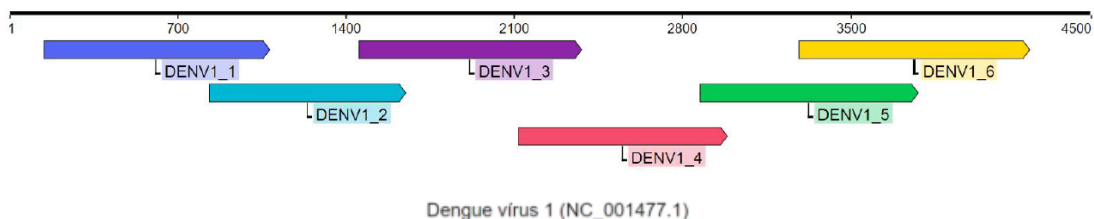


Figura 6: Mapa visual de *amplicons* do sequenciamento do DENV-1. De acordo com a Sequência de Referência no NCBI: NC_001477.1. Fonte: Imagem de autoria própria gerada pelo programa VectorBee (versão 2.1.1081, 2025) (65).

Tabela 4 - Primers utilizados para o sequenciamento de DENV-2

Primer	Sequência (5'-3')	Posição inicial*	Posição Final*	Identidade
DENV2_1_LEFT	AGCAGATCTCTGATGAATAACCAACG	85	110	100%
DENV2_1_RIGHT	TTTTTGCCATCGTCGTCACACA	1024	1045	100%
DENV2_2_LEFT	TC G CTCCTTCAATGACAATGCG	920	941	95%
DENV2_2_RIGHT	CCATTCTCAGCCTGCACTTGAG	1783	1804	100%
DENV2_3_LEFT	ACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCC	1642	1666	100%
DENV2_3_RIGHT	TGAAGGGGATTCTGGTTGGAAGT	2519	2541	100%
DENV2_4_LEFT	ATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTG	2423	2444	100%
DENV2_4_RIGHT	CGGCAGCACCATTCTGTTATGA	3341	3362	100%
DENV2_5_LEFT	TCATGCAGGCAGGAAAACGATC	2708	2729	100%
DENV2_5_RIGHT	TCTCAAGAGTAGTCCAGCTGCA	3738	3759	100%
DENV2_6_LEFT	TGGAAATCAGACCATTGAA A GAGAAAGA	3419	3446	96%
DENV2_6_RIGHT	TGGTCAGTGTGTTGTTCTTCTCTT	4397	4420	100%

* De acordo com a Sequência de Referência no NCBI: NC_001474.2.

Nota: Em vermelho são os nucleotídeos que não apresentam identidade com a sequência de referência.

Fonte: Autoria Própria.

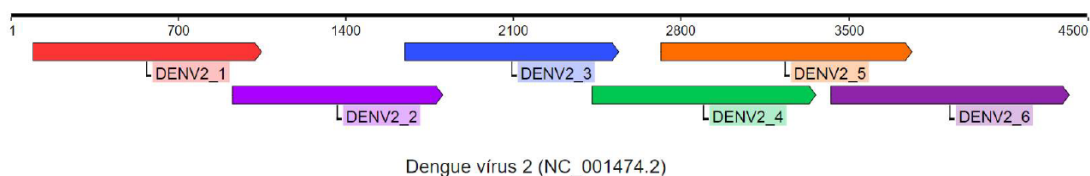


Figura 7: Mapa visual de *amplicons* do sequenciamento do DENV-2. De acordo com a Sequência de Referência no NCBI: NC_001474.2. Fonte: Imagem de autoria própria gerada pelo programa VectorBee (versão 2.1.1081, 2025) (90).

4.6.1.1. Preparo do Pool de Primers

Cada *primer* liofilizado foi reconstituído em solução para concentração estoque de 200µM. *Pools* de primers (A e B) (Tabela 5) foram preparados para concentração de 10µM.

Tabela 5 - Pool de primers A e B utilizados para Dengue 1 e 2

Dengue 1		Dengue 2	
Pool A	Pool B	Pool A	Pool B
Primers 1 (F, R)	Primers 2 (F, R)	Primers 1 (F, R)	Primers 2 (F, R)
Primers 3 (F, R)	Primers 4 (F, R)	Primers 3 (F, R)	Primers 4 (F, R)
Primers 5 (F, R)	Primers 6 (F, R)	Primers 5 (F, R)	Primers 6 (F, R)

Fonte: Autoria Própria.

4.6.2. PCR Multiplex TILING

A técnica de Multiplex Tiling PCR é uma variação da reação de PCR que tem a finalidade sintetizar *amplicons* com regiões sobrepostas como demonstrado nas Figuras 6 e 7. As reações de pool A e B foram feitas separadamente para Dengue 1 e para Dengue 2.

Amplificações das amostras foram confirmadas em eletroforese em gel de agarose seguida de inspeção visual com transiluminação com luz UV (Diamond™ Nucleic Acid Dye, Promega®).

4.6.2.1. Dengue 1

As reações de Multiplex Tiling PCR para Dengue 1 (com pool de primers A ou B) foram testadas em 2 misturas de reação diferentes (mix 1 e 2) devido a variação na concentração de primers testada (Tabela 6) . As misturas de reações seguiram as recomendações do kit de amplificação Taq DNA Polimerase™ (Sigma-Aldrich®), e contou com os seguintes reagentes: 10X Buffer + MgCl₂ (Sigma-Aldrich®); Mix de dNTP *Solution* (Amersham™ Cytiva) preparado previamente e a uma concentração de 10mM de cada; Enzima Taq DNA Polimerase™(Sigma-Aldrich®); Pool de primers (A ou B) a

uma concentração de 10mM cada (Exxtend), e água *RNAse free*.

As variações nos valores de primers utilizados nas reações entre os pools A e B, foram feitas como estratégia para otimização dos resultados.

Tabela 6 - Valores de referência para preparo de mix de reação Multiplex Tiling PCR para DENV-1

Reagentes	MIX 1	MIX 2
	1 Reação (µL)	1 Reação (µL)
Tampão 10X Buffer + MgCl ₂	4	4
Mix dNTP	0,8	0,8
Taq DNA Polimerase	0,4	0,4
Pool de primers (A ou B)	1,0	2,4
Água <i>RNAse free</i>	29,8	28,4
Total	36	36

Fonte: Informações de uso – Kit Taq DNA Polimerase™ (Sigma-Aldrich®).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador 2720 Termal Cycler™ (Applied Biosystems®), e os parâmetros da termociclagem estão descritos na Tabela 7. Após a termociclagem as amostras foram armazenadas na geladeira com temperaturas variando de 3 a 8°C até o momento da confirmação de amplificação por ensaio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 7 - Parâmetros de termociclagem da reação Multiplex Tiling PCR para DENV-1

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1 x	94 °C	30 seg
30x	94 °C	1 min
	55 °C	1 min
1 x	72 °C	1 min 30seg
	72 °C	5 min
1 x	20 °C	∞

Fonte: Informações de uso – Kit Taq DNA Polimerase™ (Sigma-Aldrich®).

4.6.2.2. Dengue 2

As reações de Multiplex Tiling PCR para Dengue 2 foram testadas em 2 misturas de reação diferentes (mix 1 e 2) devido a variação na concentração de primers testada (Tabela 8). Ambos os mix foram feitos seguindo as recomendações do kit de amplificação Pfu DNA Polimerase™ (Promega®), e contou com os seguintes reagentes: 10X Buffer + MgSO₄ (Promega®); Mix de dNTP *Solution* (Amersham™ Cytiva) preparado previamente e a uma concentração de 10mM de cada; Enzima Pfu DNA Polimerase™ (Promega®); Pool de primers (A ou B) a uma concentração de 10mM cada (Exxtend), e água *RNase free*.

As variações nos valores de primers utilizados nas reações entre os pools A e B, foram feitas como estratégia para otimização dos resultados. Amostras testas com o Mix 1 e que não apresentavam amplificação, eram então testas com o Mix 2, e vice-versa.

Tabela 8 - Valores de referência para preparo de mix de reação Multiplex Tiling PCR para DENV-2

Reagentes	MIX 1	MIX 2
	1 Reação (µL)	1 Reação (µL)
Tampão 10X Buffer + MgCl ₂	2,5	2,5
Mix dNTP	0,5	0,5
Pfu DNA Polimerase	0,75	0,75
Pool de primers (A ou B)	1,0	2
Água <i>RNase free</i>	17,75	16,75
Total	22,5	22,5

Fonte: Informações de uso – Kit Pfu DNA Polimerase™ (Promega®).

Foi utilizado o termociclador 2720 Termal Cycler™ (Applied Biosystems®), e os parâmetros da termociclagem estão descritos na Tabela 9. Após a termociclagem as amostras foram armazenadas na geladeira com temperaturas variando de 3 a 8°C até o momento da confirmação de amplificação por ensaio de eletroforese em gel de agarose como já descrito.

Tabela 9 - Parâmetros de termociclagem da reação Multiplex Tiling PCR para DENV-2

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1 x	95 °C	1 min
	95 °C	45 seg
30x	55 °C	1 min
	73 °C	4 min
1 x	73 °C	5 min
1 x	4 °C	∞

Fonte: Informações de uso – Kit Pfu DNA Polimerase™ (Promega®).

4.7. Purificação e Quantificação da Biblioteca de Sequenciamento

Bibliotecas de sequenciamento foram purificadas utilizando o sistema de cromatografia em microcolunas de sílica/celulose como fase estacionária (ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System A2893; Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a purificação, foi feita a quantificação da biblioteca, por meio da plataforma de Espectrofotômetro NanoDrop™ One UV/VIS (Thermo Scientific™), seguindo as recomendações de uso do equipamento. O nível de pureza medido pelo parâmetro de absorbância A260/A280 e quantidade de dsDNA em ng/μL foram registrados em ata. Por fim, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de preparo da biblioteca de DNA para o sequenciamento.

4.8. Preparo e Carregamento da Biblioteca

O sequenciamento foi realizado em plataforma de sequenciamento de nova geração (NSG) MinION™ Mk1D (Oxford Nanopore Technologies®). O preparo da biblioteca para o sequenciamento utilizou-se do kit Rapid Sequencing gDNA - Barcoding™ (SQK-RBK110.96) Oxford Nanopore Technology® e kit Rapid Sequencing DNA V14 - Barcoding™ (SQK-RBK114.96) Oxford Nanopore Technology®, para dengue 1 e dengue 2, respectivamente, seguindo as instruções do fabricante, com pequenas adaptações pontuais. O carregamento da biblioteca foi feito em *flow cells* FLO-

MIN114™, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Após a execução do sequenciamento, os dados das leituras foram então analisados na plataforma Epi2me Desktop (Nanoporetech™) para montagem da sequência consenso, utilizando o fluxo de trabalho para análise de dados de sequenciamento de amplicons haploide, *wf-amplicon* (91), e aplicando parâmetros de qualidade padrão do programa, apenas com alterações pontuais para otimizar os resultados.

4.9. Análise dos Dados

4.9.1. Análise Filogenética e Construção do Dendrograma

A genotipagem de DENV foi realizada com o software *Genome Detective (Dengue Typing Tool, versões 2.104 e 4.4)* (92), e informações sobre o agrupamento de sequências e validação de genotipagem foram obtidas por meio de análise de alinhamento local realizado pelo BLASTn.

As análises filogenéticas foram conduzidas por meio do pipeline do NextClade, sem a necessidade de alinhamento ou recorte manual prévio das sequências, uma vez que o posicionamento filogenético é realizado automaticamente a partir do alinhamento à sequência de referência e da inserção das amostras em uma árvore filogenética de referência previamente construída, utilizando um conjunto de dados de referência composto por genomas globais representativos da diversidade genética viral, baseado em uma sequência genômica protótipo.

A árvore filogenética de referência utilizada pelo NextClade foi previamente inferida por meio do algoritmo IQ-TREE, sob o critério de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) (93), com o modelo de substituição de nucleotídeos selecionado automaticamente pelo ModelFinder, visando ao melhor ajuste aos dados. As sequências sob análise foram alinhadas à sequência de referência primária por meio de alinhamento múltiplo e, posteriormente, posicionadas na filogenia de referência sem rearranjo da topologia previamente inferida. O posicionamento filogenético foi determinado pela identificação do ramo que maximiza a similaridade de mutações

compartilhadas, considerando exclusivamente os sítios informativos presentes nas sequências sob consulta. Sítios sem cobertura nas sequências parciais foram tratados como dados ausentes, de modo a minimizar a penalização no cálculo das distâncias filogenéticas.

5. RESULTADOS

Foram analisadas, ao todo, 94 amostras clínicas positivas para o vírus da dengue (DENV), sendo 41 amostras provenientes da epidemia de 2022 e 53 amostras da epidemia de 2024, todas oriundas do Distrito Federal (DF). A determinação do sorotipo por RT-PCR em tempo real confirmou a positividade das amostras, com exceção de duas amostras de 2024, que não amplificaram para DENV.

No ano de 2022, observou-se predominância do sorotipo DENV-1, identificado em 40 das 41 amostras analisadas (97,6%), enquanto apenas uma amostra foi classificada como DENV-2 (2,4%). Em contraste, no ano de 2024, foi evidenciada uma cocirculação entre os sorotipos DENV-1 e DENV-2, com 22 amostras positivas para DENV-1 (41,5%) e 29 para DENV-2 (54,7%), caracterizando uma mudança no perfil de circulação viral no Distrito Federal.

As amostras positivas para DENV-1 e DENV-2 foram submetidas ao protocolo de amplificação por Multiplex Tiling PCR. Das 62 amostras de DENV-1, 36 apresentaram amplificação satisfatória ($\approx 58\%$), enquanto, entre as 30 amostras de DENV-2, 25 apresentaram amplificação ($\approx 83\%$). As amostras amplificadas seguiram para o preparo das bibliotecas e sequenciamento na plataforma MinION.

Os resultados obtidos nos sequenciamentos das 36 bibliotecas de DENV-1 e 25 de DENV-2, foram então analisados no programa Epi2me utilizando o fluxo de trabalho para análise de dados *wf-amplicon* e para montagem da sequência consenso. Um exemplo do *output* (resultados gerados) pelo programa está no Apêndice A – Exemplo do Resultado Gerado pelo Epi2me. Três amostras de DENV-1 não apresentaram leituras suficientes

para a geração de consenso. As amostras de DENV-1 apresentaram qualidade média (Qscore) de aproximadamente $7,0 \pm 0,32$, com baixa profundidade média de cobertura e número reduzido de leituras. Em contraste, as amostras de DENV-2 exibiram desempenho superior, com Qscore médio de aproximadamente $14,0 \pm 0,47$ e profundidades médias de cobertura frequentemente superiores a $1.000\times$. Os parâmetros detalhados de qualidade do sequenciamento estão descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Parâmetros de qualidade do sequenciamento de DENV-1

ID Amostra	Ano da Amostra	Barcode	Número de Reads	Profundidade Média	Qualidade Média (Qscore)	Tamanho Médio dos Reads
2587	2022	1	69	19,6	7,1	413,1
2612	2022	2	201	16	7	453,3
2627	2022	3	169	40,5	7	450,3
2628	2022	4	54	8,1	7,2	447,3
2646	2022	5	244	39	7	419
2528	2022	6	261	59	7,1	425,2
2676	2022	7	314	56,3	7,1	452,6
2692	2022	8	45	6,3	7	437,2
2696	2022	9	70	17,8	7,2	451,7
2699	2022	10	57	3,7	7	421,1
2711	2022	11	94	20,3	7,4	428,6
2721	2022	12	59	13,4	7,7	397,9
2739	2022	13	240	0,4	7,7	448,9
2748	2022	14	154	3,5	7,2	450,7
2768	2022	15	127	15	6,9	430,5
2780	2022	16	40	9,1	7,3	461,4
2793	2022	17	16	3,7	6,3	378,2
2810	2022	18	34	7,8	7,6	410,9
2812	2022	19	165	37,3	7,2	424,4
2848	2022	20	49	8,1	7,2	388,6
2851	2022	21	38	4,7	7,1	451,3

Tabela 10 – Continuação

ID Amostra	Ano da Amostra	Barcode	Número de Reads	Profundidade Média	Qualidade Média (Qscore)	Tamanho Médio dos Reads
1	2024	22	26	6,6	6,3	398,8
3	2024	23	32	8,8	7,2	389,2
4	2024	24	57	16,5	6,8	452,1
7	2024	25	135	26,6	6,7	441,1
10	2024	26	638	1,3	6,7	442,8
11	2024	27	113	21,4	7,2	433,9
12	2024	28	80	15,4	7,2	419
14	2024	29	34	6	7,3	395,4
16	2024	30	725	45	7,1	460,3
21	2024	31	110	26,5	7,3	439,8
25	2024	32	40	9,4	6,7	400,8
26	2024	33	76	20,7	6,8	429,3
28	2024	34	52	12,5	7	459,7
39	2024	35	182	44,8	7,6	451,9
51	2024	36	10	1,8	6,6	433,8

Fonte: Dados do sequenciamento fornecidos pelo programa Epi2me. Autoria própria.

Tabela 11 - Parâmetros de qualidade do sequenciamento de DENV-2

ID Amostra	Ano da Amostra	Barcode	Número de Reads	Profundidade Média	Qualidade Média (Qscore)	Tamanho Médio dos Reads
2	2024	1	30976	2608	14,8	418,2
5	2024	2	22959	2710,8	14,6	379
8	2024	3	11558	646,8	14,7	343
13	2024	4	19995	4821,7	15,7	703,7
15	2024	5	24992	900,5	13,9	409,1
18	2024	6	75224	2124,1	14,1	348,5
19	2024	7	19998	6943,8	15,7	742,1
20	2024	8	5767	1132,5	14,1	378,7
24	2024	9	18149	5084,3	14,5	426,9

Tabela 11 – Continuação

ID Amostra	Ano da Amostra	Barcode	Número de Reads	Profundidade Média	Qualidade Média (Qscore)	Tamanho Médio dos Reads
29	2024	10	34570	5883,1	14,4	374,2
32	2024	11	21340	4317,8	14,7	454,4
34	2024	12	4918	1597,2	14,7	396,4
35	2024	13	14537	4198,9	14,6	417,7
37	2024	14	11537	3213,6	14,6	377,1
38	2024	15	18006	1377,9	14,3	402,5
40	2024	16	21604	7224,2	14,5	403,3
42	2024	17	19997	6997,9	15,9	761,1
43	2024	18	34949	3281,5	14,5	400,5
44	2024	19	15266	4650,1	14,5	437,2
45	2024	20	8532	212,9	14,9	231,8
46	2024	21	65691	3724,9	14,6	395,7
47	2024	22	15563	299,6	14,4	235,3
48	2024	23	16690	4671,8	14,6	427
49	2024	24	22733	2066,1	14,5	357,3
52	2024	25	15601	2000,2	14,2	412

Fonte: Dados do sequenciamento fornecidos pelo programa Epi2me. Autoria própria.

Na análise de genotipagem, todas as sequências de DENV-1, provenientes das epidemias de 2022 e 2024 no Distrito Federal, foram classificadas como pertencentes ao Genótipo V. A análise de similaridade indicou elevada identidade com sequências previamente descritas no Brasil e em outros países das Américas (Tabela 12).

As sequências de DENV-2, todas oriundas da epidemia de 2024 no Distrito Federal, foram classificadas como pertencentes ao Genótipo II (Cosmopolita), sublinhagem II_F.1.1.2. A análise por BLASTn revelou alta similaridade genética com sequências recentemente depositadas no banco de dados, provenientes principalmente de outros estados brasileiros e de contextos internacionais (Tabela 13).

Tabela 12 - Tabela de Resultados de Genotipagem e Análise de Alinhamento Local (BLASTn) para DENV-1

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
2587	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
2612	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Centro-Oeste	OR258554.1 (BRASIL: MS, 2022); OR025659.1 (BRASIL: SP, 2023)
2628	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Nordeste + Centro-Oeste	OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
2646	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
2692	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste	OQ605991.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025612.1 (BRASIL: RJ, 2023); PV436978.1 (BRASIL: AL, 2024)
2696	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
2699	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Nordeste + Centro-Oeste	KC692500.1 (ARGENTINA: BUE, 2009); MT862884.1 (BRASIL: PB, 2018); OR167158.1 (BRASIL: GO, 2023)

Tabela 12 - Continuação

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
2711	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
2721	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
2748	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Centro-Oeste + Nordeste	KC692499.1 (ARGENTINA, 2009); OR258540.1 (BRASIL: MS, 2022); OR167147.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024);
2768	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Nordeste + Centro-Oeste	MT929564.1 (BRASIL: PE, 2019); MT929556.1 (BRASIL: GO, 2019); OR575179.2 (ITALIA, 2023);
2780	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Centro-Oeste + Sudeste	OQ605994.1 (BRASIL: SP, 2022); OR258487.1 (BRASIL: MS, 2022); OR167245.1 (BRASIL: MT, 2023)
2793	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	MT862863.1 (BRASIL: PB, 2018); OR025655.1 (BRASIL: SP, 2023); PQ155011.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024)
2848	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Nordeste + Centro-Oeste	OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)

Tabela 12 - Continuação

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
2851	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	MT929564.1 (BRASIL: PE, 2019); MT929556.1 (BRASIL: GO, 2019); ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
2851	2022	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	MT929564.1 (BRASIL: PE, 2019); MT929556.1 (BRASIL: GO, 2019); ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
1	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Nordeste + Centro-Oeste	OR379326.1 (BRASIL: BA, 2021); OR167158.1 (BRASIL: GO, 2023)
3	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
11	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
12	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR654269.1 (USA: FLO - BRASIL, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)

Tabela 12 - Continuação

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
12	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR654269.1 (USA: FLO - BRASIL, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024)
14	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Nordeste + Centro-Oeste	PV436973.1 (BRASIL: AL, 2024); OQ786028.1 (BRASIL: SP, 2023); PQ155011.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024)
16	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	OR025614.1 (BRASIL: RJ, 2023); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
21	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
25	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Sul	ON426291.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025594.1 (BRASIL: SC, 2023)
26	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
39	2024	DENV-1	V	NC_001477.1	Centro-Oeste + Sudeste	OR167144.1 (BRASIL: GO, 2023); ON632088.1 (BRASIL: SP, 2022)

Tabela 12 - Continuação

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
7	2024	DENV-1	V_E	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	MT862867.1 (BRASIL: PB, 2019); ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023) OQ786026.1 (BRASIL: SP, 2023); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
28	2024	DENV-1	V_E	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
2627	2022	DENV-1	V_E.1	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
2528	2022	DENV-1	V_E.1	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
2676	2022	DENV-1	V_E.1	NC_001477.1	Sudeste + Centro-Oeste	OQ821329.1 (USA: FLO - BRASIL, 2022); OR167144.1 (BRASIL: GO, 2023); ON632088.1 (BRASIL: SP, 2022)
2810	2022	DENV-1	V_E.1	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	OR167144.1 (BRASIL: GO, 2023); ON632088.1 (BRASIL: SP, 2022); OR379326.1 (BRASIL: BA, 2021)
2812	2022	DENV-1	V_E.1	NC_001477.1	Sudeste + Centro-Oeste	OQ605994.1 (BRASIL: SP, 2022); OR167152.1 (BRASIL: GO, 2023); OQ786016.1 (BRASIL: SP, 2023)

Tabela 12 - Conclusão

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
4	2024	DENV-1	V_E.1	NC_001477.1	Sudeste + Nordeste	OQ786028.1 (BRASIL: SP, 2023); ON632049.1 (BRASIL: SP, 2022); OR025601.1 (BRASIL: PB, 2023); PV437006.1 (BRASIL: AL, 2024); OR167160.1 (BRASIL: GO, 2023)
2739	2022	DENV-1				A análise falhou na montagem da sequência consenso
10	2024	DENV-1				A análise falhou na montagem da sequência consenso
51	2024	DENV-1				A análise falhou na montagem da sequência consenso

Nota: Distribuição das sequências de referência com maior similaridade nucleotídica às amostras de DENV-1 sequenciadas no Distrito Federal, identificadas por meio de análise de similaridade pelo BLASTn. As regiões geográficas indicadas referem-se exclusivamente à origem das sequências de referência depositadas no banco de dados, não representando agrupamentos filogenéticos ou inferências evolutivas.

Fonte: Os dados foram obtidos por sequenciamento MinION e análise via *Genome Detective* e BLASTn. Dados originais da pesquisa. Autoria Própria

Tabela 13 - Tabela de Resultados de Genotipagem e Análise de Alinhamento Local (BLASTn) para DENV-2

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
15	2024	DENV-2	II	NC_001474.2	Internacional	OR821944.1 (USA: FLO, 2023); OR393920.1 (SRI LANKA, 2018); PQ155014.1 (USA: FLO – ARGENTINA, 2024); PV451714.1 (BRASIL: AL, 2024)
32	2024	DENV-2	II	NC_001474.2	América do Sul	OP599709.1 (BRASIL: MG, 2022); OM791800.1 (PERU, 2019)
43	2024	DENV-2	II	NC_001474.2	América do Sul	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); PV426487.1 (BOLIVIA, 2024); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022)
8	2024	DENV-2	II_F.1	NC_001474.2	Norte + Nordeste	OP599736.1 (BRASIL: AC, 2022); OP599765.1 (BRASIL: SE, 2022); PV451714.1 (BRASIL: AL, 2024);
13	2024	DENV-2	II_F.1.1	NC_001474.2	Centro-Oeste + Norte	PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022); OQ511274.1 (BRASIL: AC, 2021); OM744143.1 (BRASIL: GO, 2021)
18	2024	DENV-2	II_F.1.1	NC_001474.2	Internacional	MW721472.1 (CHINA, 2014); PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); MW512427.1 (SINGAPURA, 2014); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022)

Tabela 13 - Continuação

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
47	2024	DENV-2	II_F.1.1	NC_001474.2	Sudeste + Centro-Oeste	PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022); OP599663.1 (BRASIL: GO, 2021)
2	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	América do Sul	OP599709.1 (BRASIL: MG, 2022); OM791800.1 (PERU, 2019); PV451693.1 (BRASIL: AL, 2024); OP599739.1 (BRASIL: AC, 2022)
5	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022); OM744143.1 (BRASIL: GO, 2021)
19	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Norte	PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022); OQ511274.1 (BRASIL: AC, 2021); OM744143.1 (BRASIL: GO, 2021)
20	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599667.1 (BRASIL: GO, 2022); OP599663.1 (BRASIL: GO, 2021)
24	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Sudeste + Nordeste	PV451714.1 (BRASIL: AL, 2024); PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022)

Tabela 13 - Continuação

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
29	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Sudeste + Nordeste	PV451714.1 (BRASIL: AL, 2024); PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022)
34	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599667.1 (BRASIL: GO, 2022); OP599663.1 (BRASIL: GO, 2021)
35	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PV451714.1 (BRASIL: AL, 2024); PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); OP599667.1 (BRASIL: GO, 2022); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022)
37	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Nordeste	OP599762.1 (BRASIL: SE, 2022); PQ155035.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024)
38	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Sul + Norte	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); OR150707.1 (BRASIL: AM, 2023); OP599736.1 (BRASIL: AC, 2022); OR138995.1 (BRASIL: RS, 2022)
40	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022)
44	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599667.1 (BRASIL: GO, 2022)

Tabela 13 - Conclusão

ID da Amostra	Ano da Amostra	Teste Molecular (Sorotipagem)	Genótipo	Sequência de Referência	Região de origem das sequências similares (BLASTn)	Sequências de maior similaridade (BLASTn)
45	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599665.1 (BRASIL: GO, 2022); OM744143.1 (BRASIL: GO, 2021)
46	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Nordeste + Norte	OQ511274.1 (BRASIL: AC, 2021); OP599765.1 (BRASIL: SE, 2022); OP599736.1 (BRASIL: AC, 2022); OP599716.1 (BRASIL: BA, 2022)
48	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599667.1 (BRASIL: GO, 2022)
49	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Sudeste + Nordeste	PV451693.1 (BRASIL: AL, 2024); PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022)
52	2024	DENV-2	II_F.1.1.2	NC_001474.2	Centro-Oeste + Sudeste	OR150704.1 (BRASIL: AM, 2023); PQ155034.1 (USA: FLO - BRASIL, 2024); PP546320.1 (BRASIL: MG, 2022); OP599664.1 (BRASIL: GO, 2022)
42	2024	DENV-2			Não Atribuído: Sem sobreposição	

Nota: Distribuição das sequências de referência com maior similaridade nucleotídica às amostras de DENV-2 sequenciadas no Distrito Federal, identificadas por meio de análise de similaridade pelo BLASTn. As regiões geográficas indicadas referem-se exclusivamente à origem das sequências de referência depositadas no banco de dados, não representando agrupamentos filogenéticos ou inferências evolutivas.

Fonte: Os dados foram obtidos por sequenciamento MinION e análise via *Genome Detective* e BLASTn. Dados originais da pesquisa. Autoria Própria.

As sequências consenso geradas para cada amostra estão apresentadas no Apêndice B – Biblioteca de Sequências Consensus. Informações adicionais referentes ao sequenciamento e à genotipagem encontram-se descritas no Apêndice C – Dados de Sequenciamento e Genotipagem.

As sequências consenso de DENV-1 que atenderam aos critérios de qualidade foram posicionadas filogeneticamente em uma árvore de referência. Parte das amostras não atingiu os parâmetros de qualidade exigidos e, por esse motivo, não foi incluída na análise filogenética.

As sequências provenientes das epidemias de 2022 e 2024 do Distrito Federal foram alinhadas à sequência genômica de referência e posicionadas na filogenia global, sem alteração da topologia da árvore. O posicionamento das sequências de DENV-1 na árvore filogenética de referência é apresentado na Figura 8.

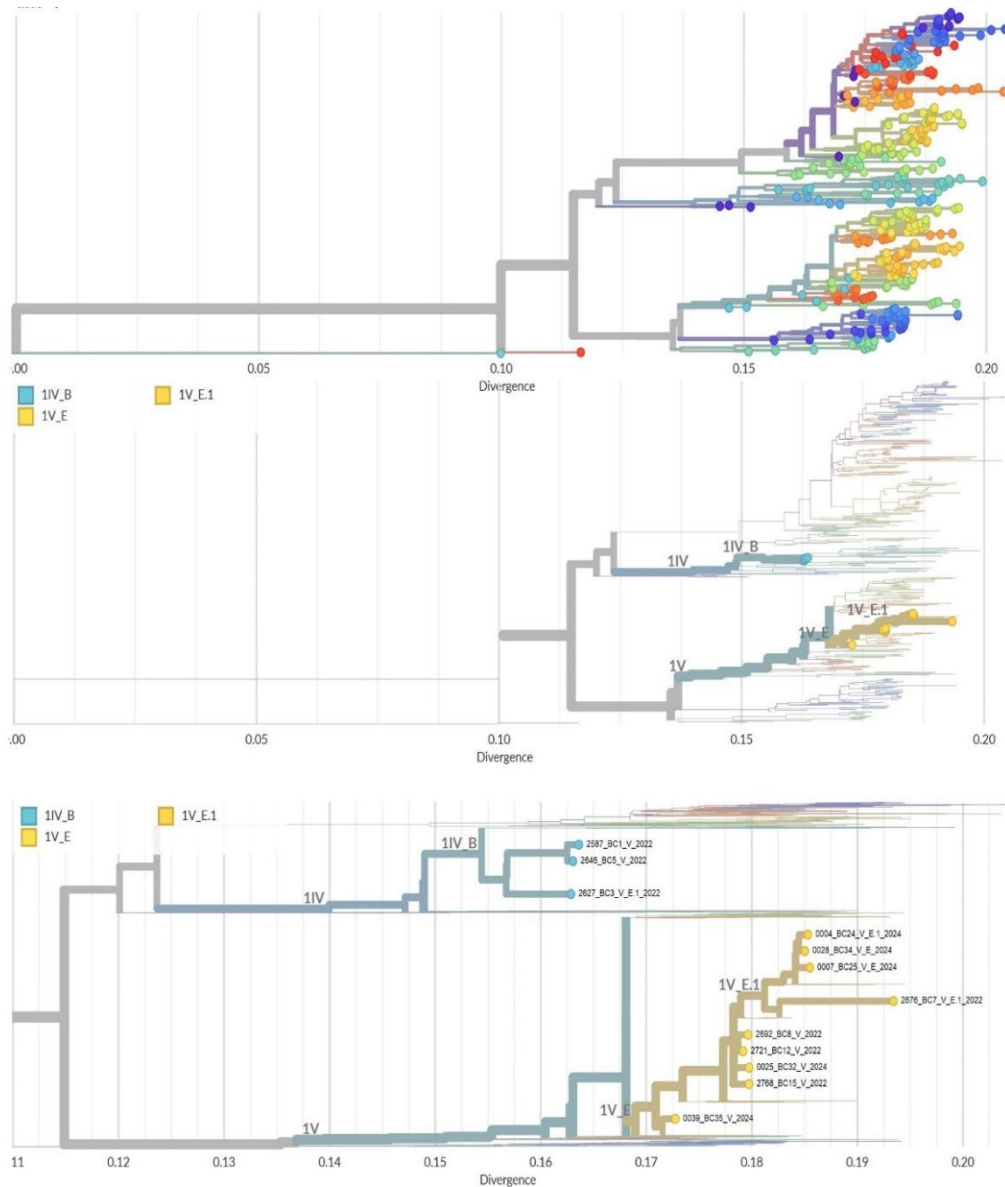


Figura 8: Posicionamento filogenético de sequências de DENV-1 (*locus* M-E). A árvore filogenética de referência foi inferida a partir de 399 genomas globais representativos da diversidade genética de DENV-1 (NextClade Dataset for "DENV-1" *Based on Reference* "Nauru/NMRI-45AZ5PDK-0/1974"), utilizando o algoritmo IQ-TREE sob o modelo de máxima verossimilhança e substituição de nucleotídeos selecionado via ModelFinder para ajuste mais adequado do modelo. As sequências de DENV-1 sob consulta foram alinhadas à referência primária via múltiplo alinhamento e inseridas na filogenia de referência sem rearranjo de topologia. O posicionamento foi determinado pela identificação do ramo que maximiza a similaridade de mutações compartilhadas, considerando apenas sítios informativos presentes nas sequências sob consulta. Sítios sem cobertura nas sequências parciais foram tratados como ausentes, penalizando minimamente o cálculo de distâncias e priorizando mutações compartilhadas em regiões informativas do *locus* M-E. Painel A - árvore filogenética de referência, com ramos proporcionais a substituições nucleotídicas por sítio, destacando clados principais de DENV-1. Painel B - posicionamento filogenético das sequências de DENV-1 (*locus* M-E) coloridas por genótipo atribuído. Painel C - ampliação de clado ilustrando posicionamento filogenético das sequências de DENV-1 (*locus* M-E). Fonte: Dados originais da pesquisa. Autoria Própria.

A árvore filogenética de referência, construída a partir de 399 genomas globais de DENV-1, possibilitou um enquadramento robusto das sequências analisadas no contexto da diversidade genética mundial do vírus, sendo a confiabilidade da topologia reforçada pelo uso de um conjunto de referência amplo e representativo, pela inferência filogenética por máxima verossimilhança implementada no IQ-TREE e pela seleção otimizada do modelo evolutivo realizada pelo ModelFinder.

As sequências de DENV-1 inseridas na filogenia apresentaram agrupamento consistente em ramos bem definidos, compartilhando mutações características com clados previamente descritos, o que permitiu sua atribuição genotípica. As sequências do Distrito Federal apresentaram proximidade filogenética com isolados previamente descritos em outras regiões do Brasil e da América do Sul, não sendo observada segregação temporal clara entre as amostras dos anos de 2022 e 2024. Todas as sequências de DENV-1 analisadas agruparam-se de forma consistente dentro de um mesmo clado correspondente ao Genótipo V, com variações entre as linhagens V_B, V_E e V_E.1.

A análise filogenética das amostras de DENV-2 provenientes da epidemia de 2024 foi conduzida utilizando o pipeline do NextClade. Parte das amostras de DENV-2 não passaram nos critérios de qualidade no NextClade e não foram incluídas no posicionamento filogenéticos das sequências.

As sequências provenientes da epidemia de 2024 no Distrito Federal foram automaticamente alinhadas à sequência genômica de referência e inseridas na filogenia global, sem alteração da topologia da árvore de referência. O posicionamento das sequências de DENV-2 na árvore filogenética de referência é apresentado na Figura 9.

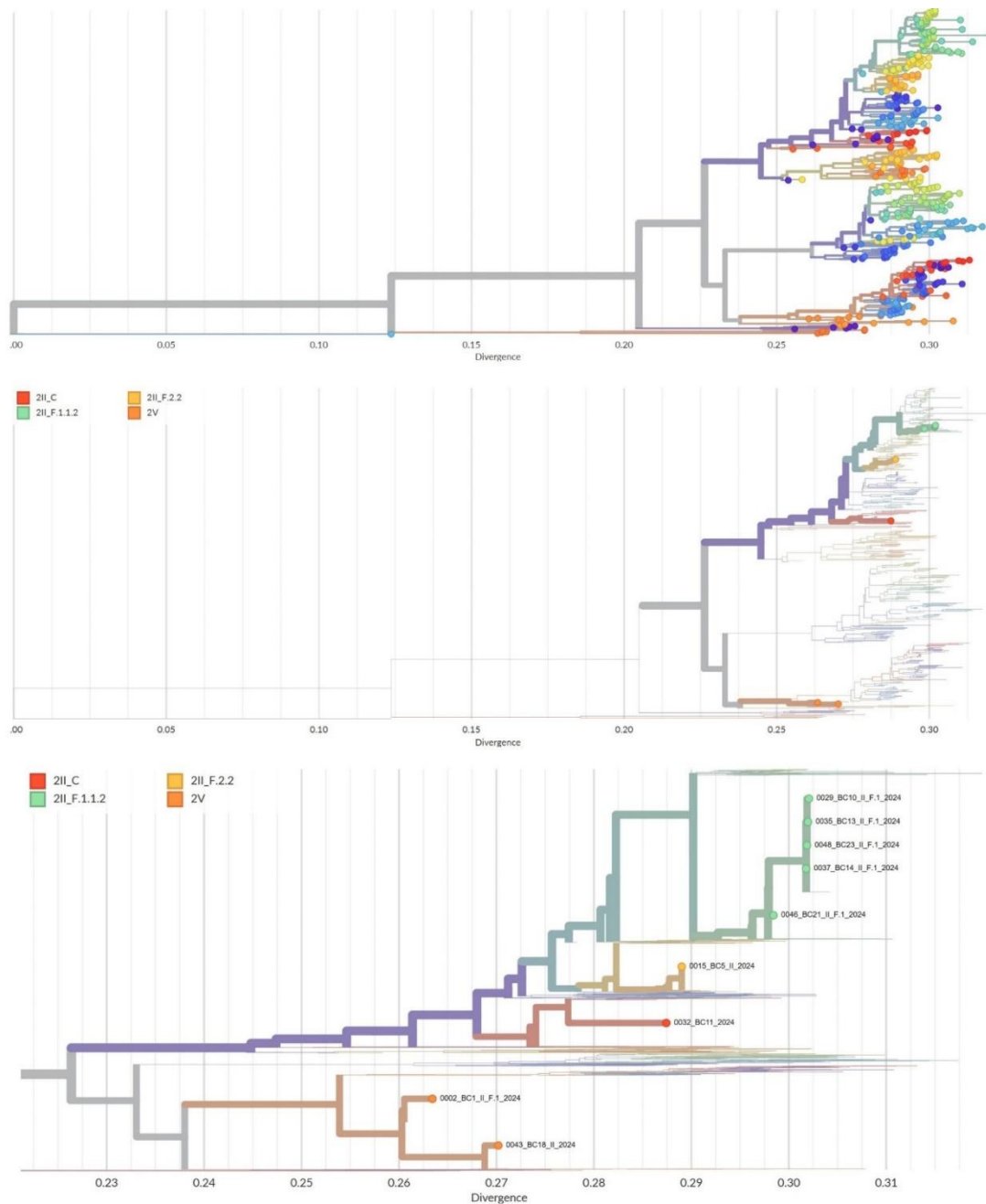


Figura 9: Posicionamento filogenético de seqüências de DENV-2 (*locus* E-NS1-NS2). A árvore filogenética de referência foi inferida a partir de 435 genomas globais representativos da diversidade genética de DENV-2 (NextClade Dataset for "DENV-2" Based on Reference "Thailand/CDC-16681/1964"), utilizando o algoritmo IQ-TREE sob o modelo de máxima verossimilhança e substituição de nucleotídeos selecionado via ModelFinder para ajuste mais adequado do modelo. As seqüências de DENV-2 sob consulta foram alinhadas à referência primária via múltiplo alinhamento e inseridas na filogenia de referência sem rearranjo de topologia. O posicionamento foi determinado pela identificação do ramo que maximiza a similaridade de mutações compartilhadas, considerando apenas sítios informativos presentes nas seqüências sob consulta. Sítios sem cobertura nas seqüências parciais foram tratados como ausentes, penalizando minimamente o cálculo de distâncias e priorizando mutações compartilhadas em regiões informativas do *locus* E-NS1-NS2. Painel A - Árvore filogenética de referência, com ramos proporcionais a substituições nucleotídicas por sítio, destacando

clados principais de DENV-2. Pínel B - Posicionamento filogenético das sequências de DENV-2 (*locus* E-NS1-NS2), coloridas por genótipo atribuído. Pínel C - Ampliação de clado ilustrando posicionamento filogenético das sequências de DENV-2 (*locus* E-NS1-NS2).

Fonte: Dados originais da pesquisa. Autoria Própria.

A filogenia de referência foi construída a partir de 435 genomas globais de DENV-2. As sequências analisadas apresentaram posicionamento consistente em ramos bem definidos da árvore filogenética, sem rearranjo da topologia de referência, compartilhando mutações características com linhagens previamente descritas.

As sequências de DENV-2 provenientes do Distrito Federal agruparam-se em clados filogenéticos distintos, correspondentes ao Genótipo II (Cosmopolita), com identificação das sublinhagens II_C, II_F.1.1.2 e II_F.2.2, e ao Genótipo V (Americano). Observou-se predominância quase exclusiva das amostras no clado do Genótipo II, com concentração das sequências em um agrupamento específico da árvore filogenética.

6. DISCUSSÃO

Este estudo realizou a caracterização molecular de amostras do vírus da dengue (DENV) circulantes no Distrito Federal (DF) durante os surtos de 2022 e 2024, revelando uma mudança expressiva no perfil de circulação viral entre os dois períodos. Os achados apontam para dinâmicas epidemiológicas distintas, com implicações relevantes para a compreensão dos fatores que culminaram na maior epidemia de dengue já registrada no DF em 2024.

Em 2022, observou-se predominância do DENV-1, responsável por 97,6% das amostras analisadas, com detecção pontual de DENV-2. Esse achado está de acordo com os dados oficiais de vigilância epidemiológica, que indicavam o DENV-1 como sorotipo majoritário no DF naquele período (87). Em contraste, em 2024 foi observado um cenário de cocirculação entre DENV-1 (40,7%) e DENV-2 (53,7%), com maior proporção de amostras deste último.

A mudança no perfil sorotípico observada entre os períodos analisados ocorreu no mesmo intervalo em que foi registrado um aumento expressivo do

número de casos de dengue em 2024, marcado pela transição de um cenário de predominância de um único sorotipo para um contexto de cocirculação, com maior proporção de DENV-2. Embora não seja possível estabelecer relações causais a partir dos dados deste estudo, variações no perfil sorotípico ao longo do tempo já foram descritas em contextos epidêmicos em diferentes regiões endêmicas. A literatura indica que mudanças nesse perfil podem estar associadas a variações na suscetibilidade populacional (4,7,82). Dessa forma, esses achados devem ser interpretados com cautela e ressaltam a importância do acompanhamento contínuo da circulação dos sorotipos virais ao longo do tempo.

Nesse contexto, é plausível que a população do DF, após um período epidêmico majoritariamente associado ao DENV-1 em 2022/2023, apresentasse baixa imunidade específica contra o DENV-2, criando condições favoráveis para a explosão de casos em 2024. A cocirculação de um sorotipo endêmico e geneticamente estável (DENV-1) com um sorotipo emergente (DENV-2) caracteriza um cenário de hiperendemicidade, que pode favorecer fenômenos imunológicos como a intensificação dependente de anticorpos (ADE) (8,94). Embora este estudo não tenha avaliado diretamente desfechos clínicos, esse mecanismo é reconhecido como potencial fator de aumento da gravidade da doença em infecções secundárias por sorotipos heterólogos.

A análise de genotipagem revelou baixa diversidade genética entre as amostras de DENV-1 sequenciadas. Todas as amostras provenientes das epidemias de 2022 e 2024 foram classificadas como pertencentes ao Genótipo V, distribuídas principalmente nas sublinhagens V, V_E e V_E.1. Esse achado é consistente com estudos prévios conduzidos em diversas regiões do país desde o Nordeste até o Sudeste e Norte que descrevem o Genótipo V como a linhagem estabelecida e amplamente disseminada no Brasil desde sua introdução nas décadas de 1980 e 1990 (9,50,68,69,95).

A baixa diversidade genética intra-genotípica observada para DENV-1 sugere que este sorotipo se comporta como componente estável do cenário hiperendêmico local, mantendo cadeias de transmissão contínuas mesmo durante períodos de menor incidência. A elevada similaridade nucleotídica

observada entre as amostras do DF e sequências provenientes de diferentes estados brasileiros sugere integração do DF ao panorama nacional de circulação do DENV-1, reforçando a importância do trânsito de pessoas na manutenção e dispersão das linhagens virais (50,66), porém inferências mais detalhadas sobre rotas de dispersão não podem ser estabelecidas a partir dos dados disponíveis.

O posicionamento filogenético das sequências de DENV-1 indicou agrupamento coeso em clados bem definidos, sem segregação evidente entre amostras provenientes de diferentes anos. Esse padrão é compatível com a circulação contínua de linhagens geneticamente relacionadas ao longo do período analisado. Mesmo com o uso de sequências parciais restritas ao *locus* M-E, o tratamento de regiões sem cobertura como dados ausentes e a priorização de sítios filogeneticamente informativos preservaram sinal filogenético para a atribuição genotípica, como evidenciado pelo agrupamento coeso observado na ampliação do clado. Ainda assim, a possibilidade de subestimação da diversidade genética intra-genotípica deve ser considerada.

Por outro lado, a análise de genotipagem indicou que todas as amostras de DENV-2 obtidas em 2024 pertenciam ao Genótipo II (Cosmopolita), com predominância quase absoluta da sublinhagem II_F.1.1.2 (23/25 amostras). Esse achado difere parcialmente dos resultados do posicionamento filogenético, no qual as sequências analisadas, majoritariamente provenientes de 2024, também foram atribuídas principalmente ao Genótipo II (Cosmopolita), porém com identificação de maior diversidade de sublinhagens, incluindo II_C, II_F.1.1.2 e II_F.2.2, além da detecção pontual do Genótipo V (Americano). Ainda assim, observou-se concentração predominante das sequências no clado associado ao Genótipo II.

O posicionamento filogenético revelou o agrupamento das sequências em ramos bem definidos da árvore de referência, com baixa dispersão entre clados. Esse padrão é compatível com a circulação de variantes geneticamente relacionadas durante o período analisado. A identificação de

mais de uma sublinhagem sugere a presença de diversidade genética detectável, embora limitada, no conjunto amostral avaliado.

Embora o Genótipo Cosmopolita seja frequentemente descrito na literatura por sua ampla distribuição geográfica e por associação a surtos de grande magnitude em diferentes regiões do mundo, incluindo o Brasil (13,45,48,78), os dados apresentados aqui permitem apenas caracterizar sua circulação no DF, não sendo possível inferir diretamente seu papel na intensidade da epidemia observada.

A elevada similaridade nucleotídica observada entre as amostras de DENV-2 do Distrito Federal e sequências provenientes de diferentes estados brasileiros, como Goiás e Minas Gerais, indica proximidade genética com vírus recentemente descritos no país, pertencentes ao genótipo Cosmopolita. Estudos conduzidos em diversas regiões do Brasil, publicados entre 2020 e 2023, documentaram a substituição progressiva do genótipo Asiático-Americano pelo genótipo Cosmopolita, incluindo a circulação de sublinhagens relacionadas à II_F (67,69,80,97).

A análise comparativa dos perfis filogenéticos de DENV-1 e DENV-2 evidencia diferenças nos padrões de agrupamento e na diversidade genética observados entre os dois sorotipos no Distrito Federal. As sequências de DENV-1, provenientes das epidemias de 2022 e 2024, apresentaram agrupamento coeso no Genótipo V, com baixa dispersão entre clados filogenéticos. Em contraste, as sequências de DENV-2 associadas à epidemia de 2024 concentraram-se predominantemente no Genótipo II (Cosmopolita), com a identificação de diferentes sublinhagens.

Esses padrões indicam dinâmicas distintas de circulação viral entre os sorotipos, com o DENV-1 apresentando maior homogeneidade genética no período analisado, enquanto o DENV-2 exibiu maior diversidade relativa. Embora os dados apontem diferenças na estrutura filogenética entre os sorotipos, interpretações sobre processos específicos, como eventos de introdução ou expansão local de linhagens, devem ser feitas com cautela e consideradas à luz das limitações amostrais e temporais do estudo. Ainda assim, os resultados reforçam a utilidade da vigilância genômica para o

monitoramento da diversidade e da circulação dos sorotipos de dengue em nível regional.

Diferenças significativas na qualidade dos dados de sequenciamento foram observadas entre os sorotipos analisados, com impacto potencial sobre a resolução filogenética e a interpretação da diversidade genética. As amostras de DENV-1 apresentaram Qscore médio inferior e menor profundidade de cobertura quando comparadas às amostras de DENV-2, que exibiram parâmetros de qualidade substancialmente mais elevados.

No sequenciamento por nanoporos, como o realizado com a plataforma MinION, variações na qualidade das leituras são esperadas em função das características intrínsecas da tecnologia. Estudos prévios indicam que leituras com Qscore em torno de 7 são geralmente consideradas aceitáveis para análises genômicas preliminares, enquanto limiares mais elevados estão associados a maior confiabilidade dos dados (98,99). Entretanto, profundidades reduzidas, especialmente abaixo de 20×, podem resultar em consensos menos robustos, com maior probabilidade de ambiguidades e erros sistemáticos, o que pode comprometer inferências filogenéticas mais finas (100).

Nesse contexto, a disparidade observada entre os dados de DENV-1 (Qscore médio ≈ 7 e baixa profundidade) e DENV-2 (Qscore médio ≈ 14 e alta profundidade) deve ser considerada na interpretação comparativa dos resultados. Parte da variação observada nas sequências de DENV-1 pode refletir limitações técnicas do sequenciamento, incluindo erros de base-calling e cobertura insuficiente, o que pode ter introduzido variações artificiais interpretadas como diferenciação filogenética. Amostras com profundidade muito baixa tendem a gerar sequências consenso menos confiáveis, podendo resultar em agrupamentos filogenéticos instáveis ou erráticos.

Em contrapartida, a elevada qualidade e profundidade dos dados obtidos para o DENV-2 conferem maior robustez às inferências filogenéticas realizadas, aumentando a probabilidade de que os padrões de agrupamento observados representem relações evolutivas reais entre as sequências analisadas (101,102). Apesar das limitações associadas às amostras de

DENV-1, os dados atenderam aos critérios mínimos de qualidade descritos na literatura para análises filogenéticas exploratórias. Ainda assim, estudos futuros com maior profundidade de cobertura e amostragem mais ampla poderão contribuir para uma caracterização mais precisa da diversidade genética viral e para o refinamento das inferências filogenéticas.

Do ponto de vista metodológico, a utilização da plataforma portátil MinION para vigilância genômica, conforme realizada neste estudo, encontra respaldo em iniciativas pioneiras conduzidas no Brasil, que demonstraram a aplicabilidade dessa tecnologia para a geração rápida de dados genômicos em contextos de vigilância em tempo real ou em cenários com recursos limitados (78,103). A capacidade de produzir informações genéticas relevantes em curto intervalo de tempo, com infraestrutura relativamente simples, torna essa abordagem particularmente valiosa para países de dimensões continentais e com distribuição heterogênea de recursos em saúde.

Nesse contexto, a vigilância genômica mostrou-se especialmente relevante ao possibilitar a identificação do genótipo Cosmopolita de DENV-2 no Distrito Federal. A detecção de mudanças no perfil sorotípico e genotípico possui potencial para subsidiar respostas mais oportunas e direcionadas por parte das autoridades de saúde, incluindo a intensificação seletiva de medidas de controle vetorial, a preparação da rede assistencial frente a possíveis aumentos na demanda por atendimento e a comunicação de risco direcionada à população. Além disso, tais informações podem contribuir para o planejamento de estratégias vacinais, considerando que vacinas atualmente disponíveis, como a Qdenga®, apresentam eficácia diferenciada entre sorotipos (104).

Entretanto, a disparidade observada na qualidade dos dados de sequenciamento entre DENV-1 e DENV-2 reforça a necessidade, amplamente destacada na literatura, de protocolos de amplificação e sequenciamento rigorosamente otimizados, bem como da adoção de critérios estritos de controle de qualidade, especialmente quando os dados são empregados em análises filogenéticas. A comparação entre os resultados mais robustos

obtidos para o DENV-2 e aqueles mais limitados para o DENV-1 ilustra de forma clara como parâmetros técnicos podem impactar diretamente a resolução e a confiabilidade das inferências evolutivas, um aspecto central para a consolidação da vigilância genômica como ferramenta estratégica em saúde pública.

A integração da vigilância genômica aos sistemas nacionais de informação em saúde, associada ao compartilhamento tempestivo de dados em plataformas abertas, como GISAID e GenBank, amplia substancialmente o impacto dessa ferramenta ao permitir análises em escala regional, nacional e global. Iniciativas como a Rede Genômica Fiocruz e o projeto CADDE evidenciam o valor da colaboração interinstitucional para a compreensão da dinâmica de dispersão viral e para a resposta rápida a emergências sanitárias (73).

Em conjunto, os achados deste estudo apontam para uma mudança no perfil sorotípico observado no Distrito Federal entre as epidemias de 2022 e 2024, com maior detecção de DENV-2 em relação ao DENV-1 no período mais recente. A análise filogenética indicou que as amostras de DENV-1 pertencem ao Genótipo V, compatível com linhagens previamente descritas no Brasil, enquanto as amostras de DENV-2 foram classificadas no Genótipo II (Cosmopolita), com predominância da sublinhagem II_F.1.1.2. Esse padrão é compatível com descrições nacionais e internacionais que relatam a expansão recente desse genótipo, embora os dados apresentados não permitam inferências diretas sobre o momento ou os mecanismos de sua introdução e disseminação no contexto local.

Embora este estudo não tenha avaliado desfechos clínicos associados às infecções, evidências da literatura internacional indicam que diferentes genótipos de DENV-2 podem estar associados a perfis distintos de virulência e potencial epidêmico. Estudos experimentais demonstraram que o genótipo Cosmopolita apresenta taxas de replicação elevadas em linhagens celulares de mamíferos e mosquitos, sugerindo possível vantagem adaptativa tanto no hospedeiro humano quanto no vetor (60). Além disso, análises antigênicas têm identificado variações entre genótipos de DENV-2 capazes de impactar a

neutralização por anticorpos induzidos por infecção prévia ou vacinação (58). No contexto brasileiro, estudos conduzidos durante a substituição do genótipo Asiático/Americano pelo Cosmopolita relataram associação com aumento da incidência de casos graves em algumas regiões (55,66), reforçando a importância da integração entre vigilância genômica e clínico-epidemiológica.

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos achados. O número de amostras sequenciadas não corresponde a uma amostragem sistemática de todo o surto, e o sequenciamento parcial, restrito a regiões específicas do genoma, pode subestimar a diversidade genética total. Adicionalmente, a ausência de dados clínicos detalhados impossibilita a correlação direta entre genótipos circulantes, gravidade dos casos e fatores de risco individuais. A disparidade na qualidade dos dados entre DENV-1 e DENV-2 também pode introduzir viés nas comparações filogenéticas, sendo possível que a diversidade genética do DENV-1 esteja subestimada ou que parte da variação observada reflita limitações técnicas do sequenciamento. A ausência de amostras representativas de DENV-2 referentes ao ano de 2022 limita ainda a avaliação da dinâmica temporal da transição genotípica.

Os resultados deste estudo abrem diversas perspectivas para investigações futuras. Análises filodinâmicas e filogeográficas com maior número de sequências poderão contribuir para estimar com maior precisão o momento de introdução do genótipo Cosmopolita no Distrito Federal e suas possíveis rotas de disseminação. Estudos de soroprevalência, investigações sobre reatividade cruzada de anticorpos, análises entomológicas e a integração de dados genômicos, clínicos, epidemiológicos e ambientais serão fundamentais para uma compreensão mais abrangente da dinâmica da dengue na região.

Por fim, este estudo contribui para o entendimento da dinâmica recente da dengue no Distrito Federal ao integrar dados epidemiológicos e genômicos obtidos a partir de amostras locais em um período de elevada transmissão viral. A caracterização filogenética dos sorotipos circulantes possibilitou a descrição do perfil genotípico das amostras analisadas e a identificação de mudanças na composição dos sorotipos detectados no período estudado. A

geração desses dados amplia o conhecimento sobre a circulação viral no Distrito Federal e destaca o potencial da vigilância genômica descentralizada como ferramenta complementar às estratégias de monitoramento, prevenção e resposta à dengue no Brasil.

7. CONCLUSÃO

A caracterização molecular e filogenética das amostras clínicas analisadas permitiu descrever o perfil genético dos vírus da dengue circulantes no Distrito Federal durante as epidemias de 2022 e 2024, evidenciando mudanças relevantes no padrão de circulação viral entre os dois períodos.

Os resultados indicam que a epidemia de 2024 esteve associada a uma alteração no sorotipo predominante, com redução da circulação do DENV-1, predominante em 2022, e aumento da participação do DENV-2, configurando um cenário de cocirculação com predomínio deste último. Enquanto as amostras de DENV-1 mantiveram-se classificadas no Genótipo V, sugerindo relativa estabilidade genética da linhagem endêmica, as amostras de DENV-2 de 2024 foram classificadas como pertencentes ao Genótipo II (Cosmopolita), com predominância da sublinhagem II_F.1.1.2.

O agrupamento filogenético coeso das sequências de DENV-2, com baixa dispersão genética, é compatível com a hipótese de introdução recente e subsequente disseminação local dessa sublinhagem, embora não seja possível descartar completamente outros cenários epidemiológicos. As análises filogenéticas também evidenciaram proximidade genética entre as sequências do Distrito Federal e vírus provenientes de outras regiões do Brasil, indicando a inserção do território em um contexto mais amplo de circulação nacional do DENV.

Os achados deste estudo reforçam o potencial da vigilância genômica como ferramenta complementar à vigilância epidemiológica, contribuindo para a detecção de mudanças no perfil de circulação viral e para o monitoramento da diversidade genética do DENV. Apesar das limitações técnicas observadas

em parte das amostras, relacionadas à cobertura e à qualidade do sequenciamento, os resultados obtidos fornecem subsídios relevantes para a compreensão da dinâmica viral local.

Em síntese, este estudo atendeu ao objetivo de determinar os sorotipos e analisar as relações filogenéticas dos vírus da dengue circulantes no Distrito Federal durante as epidemias de 2022 e 2024, evidenciando diferenças no perfil de circulação viral entre os dois períodos. A identificação dos sorotipos predominantes e a caracterização dos genótipos e linhagens associadas contribuem para a compreensão da dinâmica de circulação do DENV no território, fornecendo informações relevantes para o monitoramento epidemiológico e para o fortalecimento das estratégias de vigilância molecular no âmbito da saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Health Organization [Internet]. 2025 [cited 2026 Jan 28]. Dengue. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
2. World Health Organization. Dengue and severe dengue [Internet]. 2024 [cited 2026 Jan 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
3. Gurgel-Gonçalves R, Oliveira WK de, Croda J. The greatest Dengue epidemic in Brazil: Surveillance, Prevention, and Control. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2024;57. doi:10.1590/0037-8682-0113-2024
4. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Aug 18;2(1):16055. doi:10.1038/nrdp.2016.55
5. Adulto e criança DENGUE DIAGNÓSTICO E MANEJO CLÍNICO 6ª edição V E N D A P R O I B I D A V E N D A P R O I B I D A MINISTÉRIO DA SAÚDE [Internet]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_
6. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview. *Viruses.* 2020 Jul 30;12(8):829. doi:10.3390/v12080829

7. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015 Jan;385(9966):453–65. doi:10.1016/S0140-6736(14)60572-9
8. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012 Jun 19;30(29):4301–6. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.114 PubMed PMID: 22682286.
9. Santos Souza C dos, Caleiro GS, Claro IM, de Jesus JG, Coletti TM, da Silva CAM, et al. Phylogenetics, Epidemiology and Temporal Patterns of Dengue Virus type 1 in Araraquara, São Paulo State [Internet]. 2023. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.09.18.558374> doi:10.1101/2023.09.18.558374
10. Murugesan A, Manoharan M. Dengue Virus. In: *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* [Internet]. Elsevier; 2020. p. 281–359. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128194003000168> doi:10.1016/B978-0-12-819400-3.00016-8
11. Blok J. Genetic Relationships of the Dengue Virus Serotypes. *Journal of General Virology*. 1985 Jun 1;66(6):1323–5. doi:10.1099/0022-1317-66-6-1323
12. de Alwis R, Williams KL, Schmid MA, Lai CY, Patel B, Smith SA, et al. Dengue Viruses Are Enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. Gack MU, editor. *PLoS Pathog*. 2014 Oct 2;10(10):e1004386. doi:10.1371/journal.ppat.1004386
13. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, et al. Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity. *Sci Transl Med*. 2011 Dec 21;3(114). doi:10.1126/scitranslmed.3003084
14. Verma M, Bhatnagar S, Kumari K, Mittal N, Sukhralia S, Gopirajan AT S, et al. Highly conserved epitopes of DENV structural and non-structural proteins: Candidates for universal vaccine targets. *Gene*. 2019 May;695:18–25. doi:10.1016/j.gene.2019.02.001
15. Selhorst P, Lequime S, Dudas G, Proesmans S, Lutumba P, Katshongo F, et al. Phylogeographic analysis of dengue virus serotype 1 and

- cosmopolitan serotype 2 in Africa. *International Journal of Infectious Diseases*. 2023 Aug 1;133:46–52. doi:10.1016/j.ijid.2023.04.391 PubMed PMID: 37088357.
16. Da Saúde M. Boletim Epidemiológico SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE MINISTÉRIO DA SAÚDE. Report.
 17. Scachetti GC, Forato J, Claro IM, Hua X, Salgado BB, Vieira A, et al. Reemergence of Oropouche virus between 2023 and 2024 in Brazil [Internet]. 2024. Available from: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.07.27.24310296> doi:10.1101/2024.07.27.24310296
 18. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Mol Biol*. 2003 Nov 5;10(11):907–12. doi:10.1038/nsb990
 19. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480–96. doi:10.1128/CMR.11.3.480
 20. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe*. 2009 Apr 23;5(4):365–75. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007
 21. Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-structural Protein 4B. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Mar 31;281(13):8854–63. doi:10.1074/jbc.M512697200
 22. Paranjape SM, Harris E. Y Box-binding Protein-1 Binds to the Dengue Virus 3'-Untranslated Region and Mediates Antiviral Effects. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Oct 19;282(42):30497–508. doi:10.1074/jbc.M705755200
 23. Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM, Nouwens AS, et al. NS1' of Flaviviruses in the Japanese Encephalitis Virus Serogroup Is a Product of Ribosomal Frameshifting and Plays a Role in Viral Neuroinvasiveness. *J Virol*. 2010 Feb;84(3):1641–7. doi:10.1128/JVI.01979-09

24. Zou J, Xie X, Wang QY, Dong H, Lee MY, Kang C, et al. Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. Dermody TS, editor. *J Virol*. 2015 Apr;89(7):3455–70. doi:10.1128/JVI.03453-14
25. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jun;286(25):22147–59. doi:10.1074/jbc.M110.192500
26. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *Journal of General Virology*. 2006 Sep 1;87(9):2605–14. doi:10.1099/vir.0.81844-0
27. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1991 May;65(5):2467–75. doi:10.1128/jvi.65.5.2467-2475.1991
28. Matusan AE, Pryor MJ, Davidson AD, Wright PJ. Mutagenesis of the *Dengue Virus Type 2* NS3 Protein within and outside Helicase Motifs: Effects on Enzyme Activity and Virus Replication. *J Virol*. 2001 Oct 15;75(20):9633–43. doi:10.1128/JVI.75.20.9633-9643.2001
29. Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KHM, et al. Modulation of the Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3 (NS3) by Interaction with NS5, the RNA-dependent RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jul;280(29):27412–9. doi:10.1074/jbc.M501393200
30. Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, Jans DA. CRM1-mediated Nuclear Export of Dengue Virus RNA Polymerase NS5 Modulates Interleukin-8 Induction and Virus Production. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Jun;284(23):15589–97. doi:10.1074/jbc.M808271200
31. Dalrymple NA, Cimica V, Mackow ER. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating

- Virulence Determinant. Buchmeier MJ, editor. *mBio*. 2015 Jul;6(3). doi:10.1128/mBio.00553-15
32. Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL. Functional Characterization of cis and trans Activity of the Flavivirus NS2B-NS3 Protease. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Apr;282(17):12883–92. doi:10.1074/jbc.M611318200
 33. Ackermann M, Padmanabhan R. De Novo Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Oct;276(43):39926–37. doi:10.1074/jbc.M104248200
 34. El Sahili A, Lescar J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*. 2017 Apr 24;9(4):91. doi:10.3390/v9040091
 35. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. *Mol Biol Evol*. 2003 Jan;20(1):122–9. doi:10.1093/molbev/msg010
 36. Dieng I, Ndione MHD, Fall C, Diagne MM, Diop M, Gaye A, et al. Multifoci and multiserotypes circulation of dengue virus in Senegal between 2017 and 2018. *BMC Infect Dis*. 2021 Dec 24;21(1):867. doi:10.1186/s12879-021-06580-z
 37. Waman VP, Kolekar P, Ramtirthkar MR, Kale MM, Kulkarni-Kale U. Analysis of genotype diversity and evolution of Dengue virus serotype 2 using complete genomes. *PeerJ*. 2016 Aug 24;4:e2326. doi:10.7717/peerj.2326
 38. Umair M, Haider SA, Rehman Z, Jamal Z, Ali Q, Hakim R, et al. Genomic Characterization of Dengue Virus Outbreak in 2022 from Pakistan. *Vaccines (Basel)*. 2023 Jan 11;11(1):163. doi:10.3390/vaccines11010163
 39. Nogueira MB, Stella V, Bordignon J, Batista WC, Borba L de, Silva LHP da, et al. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Aug;103(5):483–8. doi:10.1590/S0074-02762008000500013

40. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2003. p. 19–28. doi:10.1016/S1567-1348(03)00004-2 PubMed PMID: 12797969.
41. Maria Da Silva A. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE CIRCULANTES EM PERNAMBUCO: IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS. Recife; 2013. Report.
42. Sasmono RT, Wahid I, Trimarsanto H, Yohan B, Wahyuni S, Hertanto M, et al. Genomic analysis and growth characteristic of dengue viruses from Makassar, Indonesia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015 Jun;32:165–77. doi:10.1016/j.meegid.2015.03.006
43. Austin SK, Dowd KA, Shrestha B, Nelson CA, Edeling MA, Johnson S, et al. Structural Basis of Differential Neutralization of DENV-1 Genotypes by an Antibody that Recognizes a Cryptic Epitope. *PLoS Pathog*. 2012 Oct 4;8(10):e1002930. doi:10.1371/journal.ppat.1002930
44. Wardhani P, Aryati A, Yohan B, Trimarsanto H, Setianingsih TY, Puspitasari D, et al. Clinical and virological characteristics of dengue in Surabaya, Indonesia. *PLoS One*. 2017 Jun 2;12(6):e0178443. doi:10.1371/journal.pone.0178443
45. Dutra KR, Drumond BP, de Rezende IM, Nogueira ML, de Oliveira Lopes D, Calzavara Silva CE, et al. Molecular surveillance of dengue in Minas Gerais provides insights on dengue virus 1 and 4 circulation in Brazil. *J Med Virol*. 2017 Jun 7;89(6):966–73. doi:10.1002/jmv.24729
46. Maisnam D, Billoria A, Prasad VS V, Venkataramana M. Association of Dengue Virus Serotypes 1&2 with Severe Dengue Having Deletions in Their 3'Untranslated Regions (3'UTRs). *Microorganisms*. 2023 Mar 6;11(3):666. doi:10.3390/microorganisms11030666
47. Nukui Y, Tajima S, Kotaki A, Ito M, Takasaki T, Koike K, et al. Novel Dengue Virus Type 1 from Travelers to Yap State, Micronesia. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):343–6. doi:10.3201/eid1202.050733
48. Nusa R, Prasetyowati H, Meutiawati F, Yohan B, Trimarsanto H, Setianingsih TY, et al. Molecular surveillance of Dengue in Sukabumi, West Java province, Indonesia. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2014 Jun 11;8(06):733–41. doi:10.3855/jidc.3959

49. Jiménez-Silva CL, Carreño MF, Ortiz-Baez AS, Rey LA, Villabona-Arenas CJ, Ocazionez RE. Evolutionary history and spatio-temporal dynamics of dengue virus serotypes in an endemic region of Colombia. *PLoS One*. 2018 Aug 29;13(8):e0203090. doi:10.1371/journal.pone.0203090
50. Souza UJB de, Macedo Y da SM, Santos RN dos, Cardoso FDP, Galvão JD, Gabev EE, et al. Circulation of Dengue Virus Serotype 1 Genotype V and Dengue Virus Serotype 2 Genotype III in Tocantins State, Northern Brazil, 2021–2022. *Viruses*. 2023 Oct 24;15(11):2136. doi:10.3390/v15112136
51. Rojas-Gallardo D, Ferrell T, Escobar-Pereira PM, Lopez D, Giraldo B, Restrepo-Chica J, et al. Spatiotemporal dispersion of DENV-1 genotype V in Western Colombia. *Virus Evol*. 2025 May 20;11(1). doi:10.1093/ve/veaf018
52. Amorim MT, Naveca FG, Hernández LHA, Da Paz TYB, De Oliveira CC da S, Santos A da CM, et al. Phylogenetic Reconstructions Reveal the Co-circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2 in the Northern Region of Brazil: Insights into the Persistence of the Asian-American Genotype and the Introduction of the Cosmopolitan Genotype. 2023. doi:10.20944/preprints202311.0566.v1
53. Mir D, Romero H, Fagundes de Carvalho LM, Bello G. Spatiotemporal Dynamics of DENV-2 Asian-American Genotype Lineages in the Americas. *PLoS One*. 2014 Jun 4;9(6):e98519. doi:10.1371/journal.pone.0098519
54. Jácome FC, Caldas GC, Rasinhas A da C, de Almeida ALT, de Souza DDC, Paulino AC, et al. Brazilian Dengue Virus Type 2-Associated Renal Involvement in a Murine Model: Outcomes after Infection by Two Lineages of the Asian/American Genotype. *Pathogens*. 2021 Aug 26;10(9):1084. doi:10.3390/pathogens10091084
55. Amorim MT, Naveca FG, Hernández LHA, da Paz TYB, da Silva de Oliveira CC, da Conceição Miranda Santos A, et al. Detection of a Multiple Circulation Event of Dengue Virus 2 Strains in the Northern Region of Brazil. *Trop Med Infect Dis*. 2024 Jan 9;9(1):17. doi:10.3390/tropicalmed9010017

56. Yenamandra SP, Koo C, Chiang S, Lim HSJ, Yeo ZY, Ng LC, et al. Evolution, heterogeneity and global dispersal of cosmopolitan genotype of Dengue virus type 2. *Sci Rep.* 2021 Jun 29;11(1):13496. doi:10.1038/s41598-021-92783-y
57. Jiang L, Liu Y, Su W, Cao Y, Jing Q, Wu X, et al. Circulation of genotypes of dengue virus serotype 2 in Guangzhou over a period of 20 years. *Viol J.* 2022 Dec 18;19(1):47. doi:10.1186/s12985-022-01773-7
58. Martinez DR, Yount B, Nivarthi U, Munt JE, Delacruz MJ, Whitehead SS, et al. Antigenic Variation of the Dengue Virus 2 Genotypes Impacts the Neutralization Activity of Human Antibodies in Vaccinees. *Cell Rep.* 2020 Oct;33(1):108226. doi:10.1016/j.celrep.2020.108226
59. Gallichotte EN, Baric TJ, Nivarthi U, Delacruz MJ, Graham R, Widman DG, et al. Genetic Variation between Dengue Virus Type 4 Strains Impacts Human Antibody Binding and Neutralization. *Cell Rep.* 2018 Oct;25(5):1214–24. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.006
60. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. *J Virol.* 2005 Jan 15;79(2):853–9. doi:10.1128/JVI.79.2.853-859.2005
61. Phadungsombat J, Lin MYC, Srimark N, Yamanaka A, Nakayama EE, Moolasart V, et al. Emergence of genotype Cosmopolitan of dengue virus type 2 and genotype III of dengue virus type 3 in Thailand. *Samy AM, editor. PLoS One.* 2018 Nov 12;13(11):e0207220. doi:10.1371/journal.pone.0207220
62. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014 Mar;22(3):138–46. doi:10.1016/j.tim.2013.12.011
63. Dieng I, Talla C, Barry MA, Gaye A, Balde D, Ndiaye M, et al. The Spatiotemporal Distribution and Molecular Characterization of Circulating Dengue Virus Serotypes/Genotypes in Senegal from 2019 to 2023. *Trop Med Infect Dis.* 2024 Jan 27;9(2):32. doi:10.3390/tropicalmed9020032

64. Poltep K, Phadungsombat J, Nakayama EE, Kosoltanapiwat N, Hanboonkunupakarn B, Wiriyarat W, et al. Genetic Diversity of Dengue Virus in Clinical Specimens from Bangkok, Thailand, during 2018–2020: Co-Circulation of All Four Serotypes with Multiple Genotypes and/or Clades. *Trop Med Infect Dis.* 2021 Sep 4;6(3):162. doi:10.3390/tropicalmed6030162
65. Armstrong PM, Rico-Hesse R. Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* to Infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2001 Jun;1(2):159–68. doi:10.1089/153036601316977769
66. Nunes PCG, Daumas RP, Sánchez-Arcila JC, Nogueira RMR, Horta MAP, dos Santos FB. 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. *BMC Public Health.* 2019 Dec 21;19(1):329. doi:10.1186/s12889-019-6641-4
67. Fritsch H, Moreno K, Lima IAB, Santos CS, Costa BGG, de Almeida BL, et al. Phylogenetic Reconstructions Reveal the Circulation of a Novel Dengue Virus-1V Clade and the Persistence of a Dengue Virus-2 III Genotype in Northeast Brazil. *Viruses.* 2023 Apr 28;15(5):1073. doi:10.3390/v15051073
68. de Jesus JG, Dutra KR, Sales FC da S, Claro IM, Terzian AC, Candido D da S, et al. Genomic detection of a virus lineage replacement event of dengue virus serotype 2 in Brazil, 2019. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115. doi:10.1590/0074-02760190423
69. Giovanetti M, Pereira LA, Santiago GA, Fonseca V, Paqueta M, Mendoza G, et al. Emergence of Dengue Virus Serotype 2 Cosmopolitan Genotype, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2022 Aug 1;28(8):1725–7. doi:10.3201/eid2808.220550 PubMed PMID: 35876608.
70. Adelino T, Lima M, Guimarães NR, Xavier J, Fonseca V, Tomé LMR, et al. Resurgence of Dengue Virus Serotype 3 in Minas Gerais, Brazil: A Case Report. *Pathogens.* 2024 Feb 24;13(3):202. doi:10.3390/pathogens13030202
71. Heringer M, Souza TMA, Lima M da RQ, Nunes PCG, Faria NR da C, de Bruycker-Nogueira F, et al. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil:

- case characterization following its introduction in an endemic region. BMC Infect Dis. 2017 Dec 9;17(1):410. doi:10.1186/s12879-017-2488-4
72. Romano CM, de Matos AM, Araújo ESA, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OMNPF, et al. Characterization of Dengue Virus Type 2: New Insights on the 2010 Brazilian Epidemic. PLoS One. 2010 Jul 28;5(7):e11811. doi:10.1371/journal.pone.0011811
 73. Faria NR, da Costa AC, Lourenço J, Loureiro P, Lopes ME, Ribeiro R, et al. Genomic and epidemiological characterisation of a dengue virus outbreak among blood donors in Brazil. Sci Rep. 2017 Nov 9;7(1):15216. doi:10.1038/s41598-017-15152-8
 74. Brito AF, Machado LC, Siconelli MJL, Oidtman RJ, Fauver JR, de Oliveira Carvalho RD, et al. Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. 2020. doi:10.1101/2020.08.10.20172247
 75. Rife BD, Mavian C, Chen X, Ciccozzi M, Salemi M, Min J, et al. Phylodynamic applications in 21st century global infectious disease research. Glob Health Res Policy. 2017 Dec 8;2(1):13. doi:10.1186/s41256-017-0034-y
 76. Bermann T, Gregianini TS, Godinho FM, Baethgen LF, Martiny FL, Möllmann EB, et al. Increasing dengue outbreaks in temperate Brazil is linked to *Aedes aegypti* invasion and infestation level driving widespread virus transmission. 2025. doi:10.1101/2025.02.24.25322773
 77. de Jesus JG, Dutra KR, da Silva Salles FC, Claro IM, Terzian AC, da Silva Candido D, et al. Early identification of dengue virus lineage replacement in Brazil using portable genomic surveillance. 2019. doi:10.1101/716159
 78. Adelino TÉR, Giovanetti M, Fonseca V, Xavier J, de Abreu ÁS, Nascimento VA do, et al. Portable sequencing in the field and the classroom: a retrospective examination of the circulation of DENV1 and DENV2 in Brazil. 2020. doi:10.1101/2020.09.01.20183301

79. ZUCHERATO VS. Aplicação da tecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise do metagenoma viral. São Paulo, Ribeirão Preto; 2023. Report.
80. Gräf T, Ferreira CDN, de Lima GB, de Lima RE, Machado LC, Campos T de L, et al. Multiple introductions and country-wide spread of DENV-2 genotype II (Cosmopolitan) in Brazil. *Virus Evol.* 2023 Oct 9;9(2). doi:10.1093/ve/vead059
81. Pessoa R, Patriota JV, De Lourdes De Souza M, Felix AC, Mamede N, Sanabani SS. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, Chikungunya, and dengue virus type 1. *Medicine (United States)*. 2016;95(12). doi:10.1097/MD.0000000000003201 PubMed PMID: 27015222.
82. Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2015. doi:10.1155/2015/321873 PubMed PMID: 26413514.
83. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022 - Brasil.
84. Epidemiológico B. Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Brasil. Vol. 54. 2023. Report.
85. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya, doença aguda pelo vírus zika e febre amarela até a Semana Epidemiológica 52 de 2022 - DF.
86. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya, doença aguda pelo vírus zika e febre amarela até a Semana Epidemiológica 52 de 2024, no Distrito Federal Apresentação. Report.
87. Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica 52 de 2023 no Distrito Federal Apresentação. Report.
88. Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica 29 de 2024 no Distrito Federal Apresentação. Report.
89. Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica 53 de 2025 no Distrito Federal Apresentação. Report.

90. VectorBase Consortium. VectorBase: bioinformatics resources for invertebrate vectors [Internet]. 2025 [cited 2025 Jul 19]. Available from: <https://vectorbase.org>
91. Oxford Nanopore Technologies. Oxford Nanopore Technologies Ltd. [Internet]. 2024. wf-amplicon: amplicon sequencing workflow. Available from: <https://epi2me.nanoporetech.com/epi2me-docs/workflows/wf-amplicon/>
92. Vilsker M, Moosa Y, Nooij S, Fonseca V, Ghysens Y, Dumon K, et al. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. Birol I, editor. *Bioinformatics*. 2019 Mar 1;35(5):871–3. doi:10.1093/bioinformatics/bty695
93. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, Tamura K. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. Battistuzzi FU, editor. *Mol Biol Evol*. 2024 Dec 6;41(12). doi:10.1093/molbev/msae263
94. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* (1979). 2017 Nov 17;358(6365):929–32. doi:10.1126/science.aan6836
95. Carneiro AR, Cruz ACR, Vallinoto M, Melo D de V, Ramos RTJ, Medeiros DBA, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Sep;107(6):805–12. doi:10.1590/S0074-02762012000600016
96. Amorim MT, Hernández LHA, Naveca FG, Essashika Prazeres IT, Wanzeller ALM, Silva EVP da, et al. Emergence of a New Strain of DENV-2 in South America: Introduction of the Cosmopolitan Genotype through the Brazilian-Peruvian Border. *Trop Med Infect Dis*. 2023 Jun 1;8(6):325. doi:10.3390/tropicalmed8060325
97. Ribeiro JR, Roca TP, Cartonilho G dos S, Passos-Silva AM, Moreira HM, Teixeira KS, et al. DENV-2 Outbreak Associated With Cosmopolitan Genotype Emergence in Western Brazilian Amazon. *Bioinform Biol Insights*. 2024 Jan 11;18. doi:10.1177/11779322241251581

98. Nguyen HS. Real-time analysis for Nanopore sequencing data [Internet]. The University of Queensland; 2019. Available from: <http://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:1a25707>
doi:10.14264/uql.2019.642
99. Dippenaar A, Costa Conceição E, Wells F, Loubser J, Mann B, De Diego Fuertes M, et al. Exploring the potential of Oxford Nanopore Technologies sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* sequencing: An assessment of R10 flowcells and V14 chemistry. *Chemin I*, editor. *PLoS One*. 2024 Jun 6;19(6):e0303938. doi:10.1371/journal.pone.0303938
100. Rang FJ, Kloosterman WP, de Ridder J. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol*. 2018 Dec 13;19(1):90. doi:10.1186/s13059-018-1462-9
101. Coope RJN, Matic N, Pandoh PK, Corbett RD, Smailus DE, Pleasance S, et al. Automated Library Construction and Analysis for High-Throughput Nanopore Sequencing of SARS-CoV-2. *J Appl Lab Med*. 2022 Sep 1;7(5):1025–36. doi:10.1093/jalm/jfac054
102. Vogels CBF, Hill V, Breban MI, Chaguza C, Paul LM, Sodeinde A, et al. DengueSeq: a pan-serotype whole genome amplicon sequencing protocol for dengue virus. *BMC Genomics*. 2024 May 1;25(1):433. doi:10.1186/s12864-024-10350-x
103. Naveca FG, Claro I, Giovanetti M, de Jesus JG, Xavier J, Iani FC de M, et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. *Christofferson RC*, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Mar 7;13(3):e0007065. doi:10.1371/journal.pntd.0007065
104. Biswal S, Reynales H, Saez-Llorens X, Lopez P, Borja-Tabora C, Kosalaraksa P, et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. *New England Journal of Medicine*. 2019 Nov 21;381(21):2009–19. doi:10.1056/NEJMoa1903869

ANEXO

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Infecções virais emergentes e cobertura vacinal no Distrito Federal

Pesquisador: Wildo Navegantes de Araujo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39866620.4.0000.5558

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.495.474

Apresentação do Projeto:

Trata-se de reapresentação do projeto intitulado "Infecções virais emergentes e cobertura vacinal no Distrito Federal", com respostas às pendências avaliadas no parecer anterior, datado de 18/12/2020.

Este é um estudo transversal, com expectativa de ser realizado com 7.464 indivíduos do Distrito Federal e composto por dois conjuntos de estudos: (a) estudo de acurácia de teste diagnóstico para detecção de infecção pelo SARS-CoV-2 e (b) estudos de prevalência para aferição da proporção de pessoas que apresentam anticorpos contra SARS-CoV-2, dengue, chikungunya, zika vírus, e avaliação de cobertura vacinal para sarampo, caxumba e rubéola em quatro Regiões Administrativas do DF que apresentam perfis diferentes de vulnerabilidade social (Brasília, Águas Claras, Ceilândia e Cidade Estrutural).

O estudo de acurácia será realizado com cerca de 864 indivíduos, através de visitas domiciliares. O estudo de inquérito soroepidemiológico será realizado com 6.600 indivíduos através de visitas domiciliares.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal deste estudo é estimar a prevalência da infecção por SARS-CoV-2, dengue, chikungunya e zika, assim como da cobertura vacinal para sarampo, caxumba e rubéola nos residentes de quatro Regiões Administrativas do Distrito Federal, e avaliar a acurácia de testes comerciais para detecção de anticorpos para SARS-CoV-2.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.495.474

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos atribuídos à participação no estudo citados pelo pesquisador principal são o potencial desconforto decorrente dos processos de coleta de sangue venoso, punção digital e de swab nasofaríngeo, os quais serão minimizados ao serem coletados por profissionais de saúde capacitados e habilitados; e o potencial risco de perda de confidencialidade dos dados pessoais dos participantes e as medidas que serão tomadas para minimizá-lo.

Em relação aos benefícios, cita-se que o estudo terá impacto na saúde coletiva, ao permitir a investigação da acurácia de testes diagnósticos e da compreensão da magnitude e distribuição da infecção por SARS-CoV-2, arboviroses e da cobertura vacinal de sarampo, caxumba e rubéola, o que possibilitará o planejamento da rede de serviços necessárias para o atendimento de casos, ou não, destas doenças nos próximos períodos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No parecer anterior foram apresentadas pendências relacionadas ao protocolo de armazenamento das amostras biológicas, se em biobanco ou em biorepositório, as quais foram esclarecidas pelo pesquisador.

Pendências:

1. Informar qual biobanco será utilizado pelos pesquisadores
2. Caso não haja biobanco disponível, esse colegiado recomenda que o termo "biobanco" seja substituído por biorrepositório no escopo de todos documentos do projeto.

O pesquisador esclareceu que o material biológico dos participantes será armazenado em biorrepositório, estando o consentimento (assentimento) dos participantes em relação ao uso de seu material biológico atrelado exclusivamente a este estudo.

As alterações para o termo biorrepositório e a informação de que as amostras serão utilizadas especificamente para esse estudo foram realizadas nos respectivos arquivos do projeto, incluindo os Termos de Consentimento e de Assentimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados e estão adequadamente redigidos para a avaliação deste CEP

Recomendações:

Mantenho a recomendação de atualização dos Currículos Lattes de todos os membros da equipe do estudo, para estar em conformidade com as orientações do Sistema CEP-CONEP.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.495.474

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como as pendências foram resolvidas, o parecer do colegiado foi pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após apreciação na reunião dia 08/01/2021 do colegiado CEP/FM o projeto foi aprovado. OBS: De acordo com a Resolução CNS 466/12, nos incisos II.19 e II.20, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parciais e final do seu projeto de pesquisa. Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1638920.pdf	21/12/2020 17:28:35		Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCompleto3.docx	21/12/2020 17:28:04	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto3.pdf	21/12/2020 17:27:49	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4_realce.docx	21/12/2020 17:15:07	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_resposta_pendencias3.pdf	21/12/2020 17:13:47	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4.pdf	21/12/2020 17:12:39	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4.docx	21/12/2020 17:12:01	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Orçamento	planilha_orcamento.pdf	07/12/2020 18:32:55	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Orçamento	planilha_orcamento.docx	07/12/2020 18:32:47	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	parecer_projeto_hub.pdf	07/12/2020 18:31:52	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Declaração de concordância	Termo_concordancia.pdf	07/12/2020 18:31:10	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.495.474

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/12/2020 18:23:52	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaEncaminhamento_Equipe.pdf	03/10/2020 21:43:30	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	Curriculos_EquipeDePesquisa.pdf	03/10/2020 21:41:56	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	InstrumentosColeta.pdf	03/10/2020 21:11:47	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	DeclaracaoResponsabilidade.pdf	03/10/2020 21:09:15	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	CLattes_Wildo.pdf	03/10/2020 21:07:57	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CartaEncaminhamentoFM.pdf	03/10/2020 17:27:43	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	03/10/2020 17:23:57	Willdo Navegantes de Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 11 de Janeiro de 2021

Assinado por:

**Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))**

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

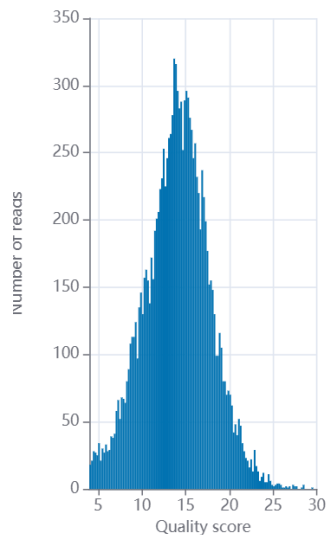
APÊNDICE A – EXEMPLO DOS RESULTADO GERADO PELO EPI2ME

barcode03 ▾

Reads 11,558	Bases 3.96441e+06	Mean length 343.0
Mean quality 14.7	Unmapped reads 9,952	Consensus length 334

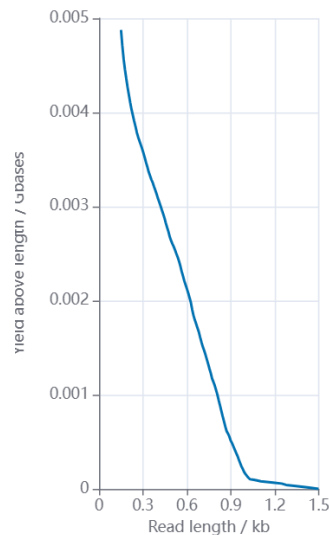
Read quality

Mean: 14.1. Median: 14.0



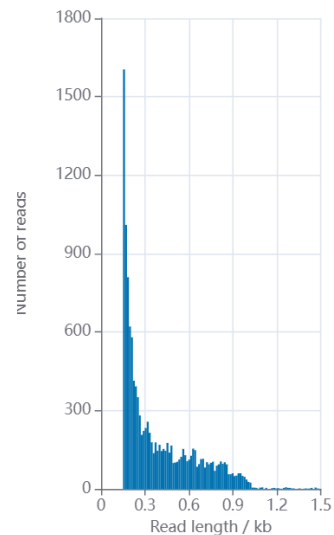
Base yield above read length

Total yield: 0.00488 Gb Gb. N50: 150kb

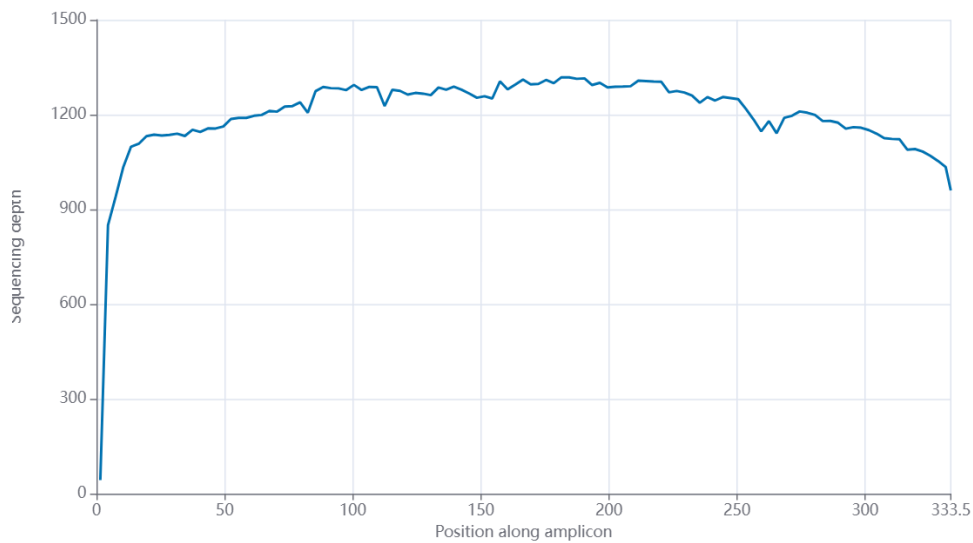


Read Length

Mean: 387.0. Median: 286.0. Min: 150. Max: 1,



Coverage along amplicon



APÊNDICE B – BIBLIOTECA DE SEQUÊNCIAS CONSENSUS

Sequenciamento DENV-1

>BARCODE01

ATGGTGATAGCTTTTTTTTAGTGCATGTGATAGGAACATCCATCACTCAAAGGG
 ATCATTTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTG
 GGAATAGGCAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGG
 ACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCA
 ACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCG
 CAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAACACACCACCACCATTCAAGATGTCC
 AACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGGAAGAACAAGACGTGAACTTTGTGTGTC
 GCCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTATGGACTATTCGAAAGG
 AAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAACTAAAGGGAAAGATA
 GTTCAATATGAAAACCTTAAAATATTCAAGTGTGATGACTGTCACACTGGGACC
 AGCACCAGGTGGAAACGAGACCACAGAACATGAACAATTGCAACCATAACACC
 TCAACTCCACGTCGGAATAACAGCTAACTGACTCAAAGCCCTGCACTGAACTCT
 CACCTAGAAACGGGCTGACTTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAAGAAAA
 ATCATGGCTTATCCACGAACAATGGTTTATAACTTACCCTGCCATGGACTTTG
 GGGGCTTCAACATCTCAAGAGACCTGGAACAGCAG

>BARCODE02

TCAGCTGTATTTCCGACGTGGAATTGAGGTGTTATTGCAATTGTTCCATGTTGT
 GGTTTCGTTCCACCTGGTGCTGCGTGTGGACAGTGATTATCACTGAATATTTA
 AGTTTTCATATTGAACTATCTTCTTAGTTTTGTCACACACTTGAAGTTGGCAC
 ACGTCAATCAACTTGAACCTCAAGTCCACAGCCATTACCCAGCCTGTCCACAAA
 CGTTGGCGACACACAAAGTTCGCTTCTTCCACCAGTGTAGCCTCTCCTTGTGT
 GGACATGAATGGTGGTGTGTTTGTATTTAGCTTCAATGCACAGTTCGCAAGA
 CGGCAGGGTTCGTGACCTCCGTCTTCAAGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTAT
 TTTTTGCCATGGTGGTGACGCAGCTTCCATGCTCCAATACCACGTCCACCCAC
 ACTCCTGACATCCTTCAACGAAGTCTGTTCCCTCCACATCGCATGGCCATTGAT
 GATGTCACCAGCATCAGCAAATGAAAATGATCCTTTTTGAGTGATGGATATTGT
 TCCTATGCATGCACTAA

>BARCODE03

GATAGCTTTTTTTAGCGCATGTATAGGAATATCCATCACTCAAAAAGGTATCATT
 TTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAAT
 AGGCAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTG
 GTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATT
 GGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAAC
 TGTGCATTGAAGCTAAAATATCAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACAC
 AAGGAGAGGCTACACTGGTGGAAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGCCG
 AACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGTGGACTATTGGAAAGGGAAAGT
 CTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAATAAGGGAAAGATAGTT
 CAATATGAAAACCTTAAAATATTCAAGTGTGATGACTGTCACACTGGGGACCAGC
 ACCAGGTGGAAACGAGACCACAGAACATGAACAATGCAACCATAACACCTCAA
 GCTCCCACGTCGGAATAACAGCTGACTGACTACAGACCCTCACACTGGACTGC
 TCACCTAGAACAGGGCTGACTTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAAGAAA
 AATCATGGCTTATCCACGAACAATGGTTTCTAACTTACCCTGCCATGGACTGG
 GGGCTTCAACATCTCAAGACCTGGAAC

>BARCODE04

TTTTAGTGATGATAGGAAATCATCACTCAAAAAGGATCATTTTCATCTTGCTGAT
 GCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGAACAGAACTC
 GTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAG

CTGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTGAAGAC
GGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACGTGCATTGAAGCTAAAATAT
CAAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAAGGCTACACTGGTGG
AAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGCCGAACGTTTGTGGACGAGGCTGG
GGTAATGGCTGTGGACTATTCGGAAAGGGAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTT
CAAGGTGTGACAAAACACTAGAGGAAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAAATATT
CAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCGGTGGAAACAGACCAC
AGAACATCGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCACGTTCGAAATACAA
CTGACTGACTAGGAGCCCTCACACTGAACTGTCACCTCAGAACGGGCTGACTT
AATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAAGAAAAATCATGGCTTATCCACAACAAT
GGTTTCTGACTTACCACTGCCATGGACTTGGGGCTTCAACATCTCGACCTGA
>BARCODE05

ATGGTGATAGCTTTTTTTAGTGCATGATAGGAACATCCATCACTCAAAGGGAT
CATTTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACCCATCAATGGCCATGCGATGCGTGG
AATAGGCAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGAC
GTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAAC
ATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTACGAACCCTGCCGTCTTGCGCA
AACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCAATTCAAGATGTCCAA
CACAAGGAGAGGCTACACTGGTGGAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGC
CGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGTGGACTATTGGAAAGGAAG
TTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGACAAAACACTAAAGGAAAGATAGTTCA
ATATGAAAACCTAAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCACACTGGGACCAGCAC
AGGTGGAAACAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAACT
CCCACGTTCGAAATACAGCTGACTGACTACCAAGCCCTACACTGAACTGCTCA
CCTAGAAACGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAAAAAAT
CATGGCTTATCCACAACAATGGTTTCTAACTTACCACTGCCATGACTGGGGCTT
CAACATCTCAGGACCTGAACA

>BARCODE06

GTTCAAGTCTCTTGAGATGTTGAAGCCCCAAGTCCATGGCAGTGGTAAGTTA
GAAACCATTGTTTCGTGGACAAGCCATGATTTTTCTTTCATTGTCAATAGCACCAT
CTCATTAAGTCCAGCCCTGTTCTAGGTGAGCAGTCCAGTGTGAGGGCTCCTAG
TCAGTCAGCTGTATTTCCGACGTGGAGCTTGAGGTGTTATGGTTGCAATTGTTT
ATGTTCTGTGGTTCCACCTGGTGCTGGTCCCAGTGTGGACAGTGACTATCAC
TGAATATTTTAAGTTTTCATATTGAACTATCTTCCCTCTAGTTTTTTCACACACTT
GAACTTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTTTGAATAGTCCACAGCCATTACCC
AGCCTCTGTCCACAAACGTTCCGGCGACACACAAAGTTCGCGTCTTGTTCTTCCA
CCAGTGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGAATGGTGGTGTGTTTGTAT
TTTAGCTTCAATGCACAGTTTTCGCAAGACGGCAGGTTTCGTGACCTCCGTCTT
CAAGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTTCCATGGTGGTGACGCAGCT
TCCATGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGCTCCTGACAGTCCTTCAACGAA
GTCTCTGTTGCCTATTCCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTCAACCAGCA
TCAGCAAGATGAAAATGATCCCTTTTGAAGTGTGATGATATTCTATAGCATGCAC
TAAAAAAGCTATGGCC

>BARCODE07

GACTTCGGTTATAGGAGGAGTGTTCACATCTGGGAAAATTGGTACATCAGGTTT
TGACGCATATGGGTTTGTAGTGGTGTGGATGAAAATAGGAATAGGGATTTGC
TGACATGGTTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACTTTTCATGTGCGTTGCAGT
TGGCATGGTCAATGTACAGGAGTCATGGTTCAAGCGGATTTCGGATGTGTAAT
CAACTGGAAGGCAGAGAATTAATGTGGAAGTGGCATTTTGTCACTAATGAAG
TCCACACTTGACAGAGCAATCAAATTCAGGCTGACTCCCAAAGACTGTCAGCA
GCCATTGGAAAGGCATGGAGGAGGGCGTATGTGGGATTGATGGCCATAGCTTT

TTTTAGCGCATGCTATAGGAACATCCATCACTCAAAAAGGGATCATTTTTCATCTT
 GCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACA
 GAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGTGGACGTGGTATTGGAG
 CATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAA
 CTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACCTGTGCATTGA
 AGCTAAAATATCAAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGG
 CTACACTGGTGGAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGCCGAACGTTTGTG
 GACAGAGGCTGGGTAATGGCTGTGGACTATTCGGAAAGGGAAGTCTATTGACG
 TGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAACCTAGAGGGAAAGATAGTTCAATATGAA
 AACTTAAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGACCAGCACCAGGTG
 GAAACAGACCACAGAACATGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCACG
 GCGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCCCTCACACTGAACTGCTCACCTAG
 AACGGGCTGACTTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAAGAAAAATCATGGC
 TTATCCACGAACAATGGTTTTCAACTTACCATTGCCATGGACTTAGGGGCTTCA
 ACACCT

>BARCODE08

CGATCACTCAAAAGGGATCATTTTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAAT
 GGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTTGTTGAAGGACTGTCAG
 GAGCAACGTGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATG
 GCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAAC
 CCTGCCGTCTTGAAACTGTGCATTGAAGCCAAAATATCAACACCACCACCGAT
 TCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGGAGAACAAGACGCGAA
 CTTTGTGTGTCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGTGGACT
 ATTCGGAAAGGGAAGTCTATTGACGTGTGCCGAGTTCAAGTGTGTGACAAAAC
 AAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTTAAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCCA
 CACTGGGACCAGCACCAGGTGGACAACACAACATGGAACAATTCAACCATAA
 CACCTCAAGCTCCACGTGCGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCCCTCCACT
 GAACTCTCACCTAGAACAGGCTGACTTTATGATGGTGCTATTGACAATGAAAGA
 AAATCATGGCTTATCCACAACAATGGTTTCTAACTTACCCTGCCATGGACTTC
 GG

>BARCODE09

TTGATGTTGAAGCCCAAGTCCATGGCAGTGGTAAGTTTAAACCATTGTTGTGGA
 TAAGCCATGATTTTCCTTTTCATTGTCAATAGCACCATCTCATTAAAGTCAGCCCT
 GTTCTAGGTGACAGTTCAGTGTGAGGCTCTGAGTCAGTCAGCTGTATTTCCG
 ACGTGGAAGCTTGAGGTGTTATGGTCGCAATTGTTTCATGTTCTGTGGTCTCGT
 TCCACCTGGTGCTGGTCCCAGTGTGGACATGACTATCACTGAATATTTTAAGTT
 TTCATATTGAACTATCTTTCTCTAGTTTTGTCACACACTTGAAGTGGCACACGT
 CAATAGACTTCCCTTCCAATAGTCCACAGCCATTACCCAGCCTCTGTCCACAAA
 CGTTCGGCGACACACAAAGTTCACGTCTTGTTCTTACCAGTGTAGCCTCTCCT
 TGTGTTGGACATCTTGAATCGGTGGTGGTGGTTTATATTTTAGCTTCAATGCAC
 AGTTTTTCGCAAGACGGCAGGGTTCGTGACCTCCGTCTTCAAGAGTTCAATGTC
 CAATGTTGGTTTATTTTTTGGCATGGTGGTACGCAGCTTCCATGCTCCAATAC
 CACGTCCACCCACGTTGCTCCTGACAGTCCTTCAACGAAGTCTCTGTTGCCTAT
 TCCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTACCAGCATCAGCAAGATGAAAA
 TGATCCCTTTTTGAGTGATGGATATTCTATAGCATGCACTAAAAAAGAGCTAT
 CAC

>BARCODE10

ATCATCAAAAGGATCATTTTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCC
 ATGCGATGCGTGGGAATAGGCAAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCA
 ACGTGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAA
 ATAACCAACATTGGACATTGAACTTTGAAGACGGAGGTCACGAACCTGCCGT

CTTCGCAAACACTGTGCATGAACTTAAAATATCAAATCACCACACCATTCAAGATGT
 CCAACACGAGGAGAGGCTACACTGGTGAAGCAGAGACGCGAACTTTGTGTGT
 CTGCAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTATGGACTATCGGAAAGG
 GAAATGTCTATTGACGTGTGCCAGTTCAAGTGTGTGAAAATAAGGGAAAGATG
 TTCATATGAAAGTTAAAATTTCAAGTATAGTCACGCTGGAATTTCTCAGGCCAG
 GTGGAAACGACACCAACATCGAACAATGCACCCGTAACGCCTCAAGCTCCCGT
 CGAAATACAGCTAACTGACTACGAGCCCTGCTTCAACTGTTCTAGCCAGGCTG
 ACTTGTGGATAGTGCTATGGCGATGAAGGAAATTTATCGCTTATTCACACGAA
 CAATGGTTTCTGATTACCACTGCCATGATTTGGGGG

>BARCODE11

TTTTAGTGACGATAGGAATATCATCACTCAAAGGGATCATTTTCATCTTGCTG
 ATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGAATAGGCAACAGAGAC
 TTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGA
 AGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTG
 AAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAA
 AATATCAAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACT
 GGTGAAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGG
 CTGGGTAATGGCTGTGGACTATTCGGAAAGGGAAAGTCTATTGACGTGTGCCAA
 GTTCAAGTGTGATGACAAAATAAGGGAAAGATAGTTCAATATGAAAATAA
 AATATTCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGACCACATCAGGTGGAAGAGAC
 CACAGAACATGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCACGTCGGAAATAC
 AGCTGACTGACTCAGGAGCCCTCACACTGGACTGCTCACCTAAAACGGGCTGG
 ACTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAAGAAAATCATGGCTTGTCCACGA
 ACAATGGTTTTAACTTACCACTGCCATGGACTTTGGGGGCTTCAACACTCAAG
 AGACCTGGAACAAGC

>BARCODE12

CATCACTCAAAGGGATCATTTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACTCAATGGCC
 ATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTTGTTGAAGGACTGTCAGGAGC
 AACGTGGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCA
 AAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCT
 GCCGTCTTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCGAT
 TCAATATCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGGAAACAAGACGCGAACT
 TTGTGTGTCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTGTGGACTA
 TTCGGAAAGGAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAATGTGTGACAAAATAAG
 AGGGAAAGATAGTTCAATATGAAAATAAATAATTCAGTGATAGTCACTGTCCA
 CACTGGGGACCAGCACCAGGTGGGAACAGACCACAGAACATGAACAATTGCA
 ACCATAACACCTCAAGCTCCACATCGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCC
 CTCACACTGAACTGCTCACCTAACGGGCTGGACTTAATGAGATGGTGCTATT
 GACAATGAAAATCATGGCTTATCCACGAACAATGGTTTCTAATTACCACTGCC
 ATGGACTTCGGGG

>BARCODE14

TTTATGTTCTGTGGTCTCCACCTGGTGCTGGTCCCAGTGTGGACAGTGAATC
 ACTGAATATTTAAGTTTTTCATATTGAACTATCTTTCTAGTTTTGTCACACATTG
 AACTTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTTCCAATAGTCCACAGCCATTACCCA
 GCCTCTGTCCACAAACGTTTCGGCGACACACAAAGTTCATCGTTCTTCCACCAGT
 GTAGCCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGAATCGGTGGTGGTGTGTTGATATTTT
 TAGCTTCAATGCACAGTTCAACGGAGTCGTGACCTCCGTTTCAGAGTTCCAATG
 TCAATGTTCAATATTTTTGCAGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGCTCCT
 GACAGTCTTCAACGAAGTCTGTTGCCTATTCACGCATCGCATGGCCATTG
 ATGGTGTACCAGCATCAGCAAGATGAAAATGATCCCTTTTT

>BARCODE18

CCCTGAAGTCCATGGCAGTGGTAAGTTAGAAACCATTGTTTGTGGACAAGCCA
TGATTTTTTTTTATTATAGCACCATCTCATTAAAGTCCAGCCCTGTTCTAGGTGA
GCAGTCCAGTGTGAGGCTCGTGGTCAGTTAGCTGTATTTCCGACGTGGAGCTT
GAGGTGTTATGGTTGCAATTGTTTCATGTTCTGTGGTCTCGTTTTCCACCTGGTGC
TGCCAGTGTGACAGTGAATATCTACTGAATATTTTAAGTTTTTCATATTGAACTAT
CTTCTAGTTTTGTCACACACTTGAACCTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTCCG
ATATCCACAGCCATTACCCCAGCCCTGTCCACAAACGTTTCGGCGACACACAA
GTTACAGTCTTGTCTTCCACCAGTGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGA
ATCGGTGGTGTGATGTTGATATTTTAGCTTCAATGCACAGTTTGCACAAGACGGCA
GGGTTTCGTGACCTCCCGTCTTCAAGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTT
GCCATGGTGGTGACGCAGCTTCCATGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGC
TCCTGACAGTCTTCAACGAAGTTCTGTTGCCTATTTCCACGCATCGCATGGCC
ATTGATGGTGTACCAGCATCAGCAAGATGAAAATGATCCTTTTTGAGTGATGG
ATGTTCCCTATAGCATGCCTAAAAAAGCTATACC

>BARCODE19

TGTTCCAGGTCTGAGATGTTGAAGCCCCAAGTCCATGGCAGTGGTAAGTCTAG
AAACCATTGTTTGTGGATAAGCCATGATTTTTCTTTTCATTGTCAATAGCACCAT
CTCATTAAAGTCAGCCCGTTCTAGGTGAGCAGTTCAGTGTGAGGGCTCCGTAG
TCAGTCAGCTGTATTTCCGACGTGGAGCTTGAAGTGTGTTATGGTTGCAATTGTT
ATGTTCTGTGGTCTCGTTTTCCACCTGGTGCTGGTCCCAGTGTGGACAGTGAAT
ATCACTGAATATTTTAAGTTTTTCATATTGAACTATCTTTCCCTCTAGTTTTGTCAC
ACTTGAACCTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTTCCGAATAGTCCACAGCCAT
TACCCAGCCTCTGTCCACAAACGTTTCGGCGACACACAAAGTTGCGTCTTGTCT
TCCACCAGTGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGAATCGGTGGTGGTTTTG
ATATTAGCTTCAATGCACAGTTTGCACAAGACGGCAGGGTTCGTGACCTCCGT
CTTCAAGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTTCCATGGTGGTGACGCA
GCTTCCGTGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGCTCCTGACAGTCTTCAA
CGAAGTCTCTGTTGCCTATTTCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTACC
AGCATCAGCAAGATGAAAATGATCCTTTTTGAGTGATGGATGTTCCCTATAGCA
TGCGCTAAAAAAGAGCTATCACCT

>BARCODE20

CCGTTGTTCCAGGTCTCTTGAGATGTTGAAGCCCCGAAGTCCATGGCAGTGG
TAAGTTAGAAACCATTGTTTCGTGGATAAGCCATGATTTTTTTCATTGTCAATAGC
ACCATCTCATTAAAGTCCAGCCCGTTCTAGGTGAGCAGTCCAGTGTGAGGGCT
TCAGTCAGTCAGCTGTATTTCCGACGTGGGAGCTTGAAGTGTGTTATGGTTGCAA
TTGTTTCATGTTCTGTTCTTTTTCCACCTGGTGCTGGTCCCAGTGTGACAGTGAC
TATCACTGAATATTTTAAGTTTTTCATATTGAACTATCTTTCCCTCTAGTTTTGTCA
CACACTTGAACCTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTTCCGAATAGTCCACAGCC
ATTACCCAGCCTCTGTCCACAAACGTTTCGGCGACACAGAAATTCGCTCTTTCT
TCTTACCAGTGTAGCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGAATCGGTGGTGGTGT
GATATTTAGCTTAAATGCACAGTTTGCACAACGGCAGGGTTCGTGACCTCCGT
CTTCCAGGGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTTCCATGGTGGTGACAGC
TTCCATGTAACCACGTCCACCACGTTGCTCCTGACAGTCTTCAACAAAGTCTC
TGTTGCCTATTTCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTG

>BARCODE21

CACACGAGGGGAGAGCACATGATATTCATGAGCAGGAAGGGAAATCACTCTTT
TTAAGGCCTCTGGGCGTCGATGTGCCACCCTCATTGCGATGCTGGAGGGTTGT
GAACGATGACTAAATCGCCCCGGATCACTGGCGAACC GGATGACGTTGACTGC
TGGTGCAATGCCACGACACATCGGTGACCTATGGGACGTGTTCTCAAACCGGC
AACCGGGCGAAACGTTTCGTGGCACTCGCCCCACGTCAACTGGTCTGAACAAA

GAACATGGATGTCCTCTGAAGGCGCTGGAAACAAATACAAAAATTGAACTGG
 GCTTTTCGACGCCAGTCACGGTGATAGCTCTTTTTAGCGCATGCTCTAGGAAC
 ATCCATCACTCAAAGGGATCATTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAA
 TGGCCATGCGATGCGTGGAATAGGCAAGAAAGACTTCGTTGAAGGACTGTCA
 GGAGCAACGTGGTGGACGTGGTATTGGAACATGGAAGCTGCGTCACCACCAT
 GGCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGA
 ACCTGCCGTCTTGCGCAAACCTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAACATCACCACC
 GATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACGCTGGTGAAGAACAAGACGCG
 AACTTTGTGTGTCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTGTGG
 ATGATTGGAAAGGGAAGTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAGAG
 GAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAATATTCAAGTATACTGTACACTGGGA
 CCAGCACCAGGTGGAAAGAACATAGAACATGGAACAATTGAAC

>BARCODE22

GATAGCTTTTTTAGTGATGATAGGAATATTCATCACTCAAAGGGATCATTTCAT
 TCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGAATAGGCA
 ACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTGGTATTG
 GAGATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGACATT
 GAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTTCTGCGCAAACCTGTGCAT
 TGAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCAGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAG
 AGGCTGCACTGGTGGAAACAAAAGACGTGAACTTTTTCGCTCGCTGAACGTTTGT
 GGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGTGGAATTATTGGAAAGGAAGTTATTGACGT
 GTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAACCTAGAGGAAAGATAGTTCAATATAAAAC
 TAAAATATTCAGTGATAATCACTGTCCACACTGGTACCAGCACCAGGTGGAAA
 CGAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCACAGT
 CGAAATACAGCTGACTGACTACGCACCCTCACACTGGACTGTCACCTAAAACA
 AGCTGACTTTAATGAGATGTTGACAATGAAAAGAAATCATCGCTTGCCACAAC
 AATCGTTTCTGCTTACCCTGCCATGAACTCAGGGCTTCAACATCGACCTAAAA
 C

>BARCODE23

TGTTCCAGGTCTCTTGAGATGTTGAAGCCCCAAGTCATGGCAGTGGAGTTAGA
 AACTCATTGTTGTGGATAAGCCATGATTTTCTTTTCATTGTCAATAGCACCATCTC
 ATTAAGTCAGCCCGTTGAGGTGAGCAGTTCAGTGTGAGGGCTCCTAGTCAGTC
 AGCTGTATTTCCGACGTGGAGCTTGAGGTGTTATGGTTGCAATTGTTCCATGTT
 CTGTGGTCTCTTCCACCTGCGCTGGTCCAGTGTGGACAGTGACTATCACTGA
 ATATTTTAAGTTTTCATATTGAACTATCTTTCCCTCTAGTTTTGTACACACTTGA
 ACTTGGCACACGTCAATAGATTTCCCTTTCCAATAGTCCACAGCCATTTCCCCA
 GCCTCTGTCCACAAACGTTTCGGCGACACACAAAGTTCGCGTCTTGTTCTTCCA
 CCATGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGAATCGGTGGTGTGATGTTGATATT
 TTAGCTTCAATGCACAGTTTTGCACAACGGCAGGGTTCGTGACCTCCGTCTTCA
 AGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTTGGCCATGGTGGTGACGCAGCTTC
 CATGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGCTCCTGACAGTCCTTCAACGAAG
 TCTCTGTTCCATTCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTCAACCAGCATCAG
 CAAGATGAAAATGATCCCTTTTGAAGTGTGATGGATTTCTATACATGCACTAAAAA
 A

>BARCODE24

CAGCTTTTTTTAGCGCATGCTATAGGAATATCCATCACTCAAAGGGATCATTTC
 CATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGAATAGG
 CAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTGGTAT
 TGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGAC
 ATTGAACCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTTTCGCAAACCTGTGC
 ATTGAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCAATTCAAGATGTCCAACACAAGGA

TTGCGCAAACGGCAGGGTTCGTGACCTCCGTCTTCAGGAGTTCAATGTCCAAT
 GTTGGTTTTATTTTTGCCATGGTGGTGACGCAGCTTCCATGCTCCAATACCACG
 TCCACCCACGTTGCTCCTGACAGTCCTTCAACGAAGTCTCTGTTGCCTATTCCC
 ACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTCAACCAGCATCAGCAAGATGAAAATGAT
 CCCTTTTGAGTGATGGATATTCCTATAGCATGCGCTAAAAAAGCTATCACCA
 >BARCODE29

GAAGTCCATGGCAGTGATGTCAAAGTCATTGTTTGTGGACAGCCATGATTTCTT
 CATTGTCAATACCATCTGATTAAGTTGCCTGTTGAGGTGACATCCAGTGTGAGG
 CTTGCGTTAGTAAGTCAGCTTATTTCAATCGATGTGGAGTTGAGGTGTTATGGTT
 CAATTGTTGATGTTTATCATTTCGCCACCTGTAATCCCAGTGTGACATGGATTA
 TCACTCATATTTAAGTTTTCAATTGAACTATCTTTCCTCGTTTTGTCACACTTGA
 ACTTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTCGATCATCCACAGCCATAACCCAGC
 CTCGTCCACAAACGTTCCGGCGACACACAAAGTTCCGCGTCTTGTTCTTCCACCA
 GTGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTGAAATCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 AGCTTCAATGCACAGTTTGCGCAAGACGGCAGGGTTCGTGACCTCCGTCTTCA
 AGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTGCCATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CATGCTCCAATACCACGTCCACCACATGCTCCTGACAGTCCTTCAACGAATCTC
 TGTTGCCTATTCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTCAACCAGCATCAGCA
 AGATGAAAATGATCCTTTTGAGTGATGGATGTTCTATCGCATCGCTAAAAAAG
 CTATCACCTG
 >BARCODE30

CATGCTATAGGAACATCATCACTCAAAAAGATCATTTTCATCTTGCTGATGCTG
 GTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACAGAATTCGTTG
 AAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTGGTATTGGACATGGAAGCTGC
 GTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACG
 GAGGTCAAACAACCCTGCCGTCTTGAAACTGTGCATTGATCAAAAATCAAACA
 CCACCACCATTCAAGATGTCCAACACAATGAGGCTACACTGGTGGAGAGACCA
 AAATGAATTTGTCTGCCGCCGAACGTTTGTGGACAAGGCTGGGTAATGGCTGT
 GGACTATCAATCGAAAACTATTGACTGTGCCAAGTTAATGTGTGACAAAATA
 GAGGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACTTAAAATATTCAGTGATAGTCAGTCCA
 CACTGGAACCACAGGTGGAACCAGACCACAGAACATGAACAATTGCAACCAT
 AACACCTCAAGCTCCTACGTCGGAAAATACACTGACTGAAACAGAAGCCTCAC
 ACTGGACTGCTCACCTAAAACAGGGCTGGACTTAATGAGATGGTGGCTTTGACA
 ATGAAAGAAAAATCATGGCTTATCCACAAACAATGGTTTCTCAACCTACCACTG
 CCATG

>BARCODE31

CCGCTGTTCCAGGTCTGAGATGTTGAAGCCCCGAAGTCCATGGCAGTGGTAA
 GTCAGAAACCATTGTTGCTGGATAAGCCATGATTTTTCTTTCATTGTCAATAGCA
 CCATCTCATTAAAGTCAGCCCTGTTCTAGGTGACAGTCCAGTGTGAGGCTCCT
 GAGTCAGTCAGCTGATTTCCGACGTGGAGCTTGAGGTGTTATGGTTCAATTGT
 TCATGTTCTGTGGTCTGTTTCCACCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CTATCACTGAATATTTAAGTTTTCATATTGAACTATCTTTCCTCTAGTTTTGTCA
 CACTTTGAACTTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTCCGAATAGTCCACAGCC
 ATTACCCACAGCCTCTGTCCACAAACGTTCCGGCGACACAAAGTTCCGCGTCTTGTT
 CTTCCACCAGTGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATATTTGAATGGTGGTGGTGGT
 TTGATATTTTAGCTTCAATGCACAGTTTGCGCAAGACGGCAGGGTTCGTGACCT
 CCGTCTTCAAGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTGCCATGGTGGTGA
 CGCAGCTTCCATGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGCTCCTGACAGTCCT
 TCAACGAAGTCTCTGTTGCCTATTCCACGCATCGCATGGCCATTGATGGTGTCA
 CCAGCATCAGCAAGATGAAAATGATCCTTTTTGAGTGATGGATGTTCTATAG
 CATGCGCTAAAAAAGCTATCACCAT

>BARCODE32

AGCTTTTTTTAGTGATGATGATAGGAATATCCATCACTCAAAGGGATCATTTC
 ATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGG
 CAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTGGTAT
 TGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGAC
 ATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACCTGTG
 CATTGAAGCTGAAAATATCAAACACCACCACCATTCAAGATGTCCAACACAAGG
 AGAGGCTACACTGGTGAAGAACAACGCGAACTTTGTGTGTCGCCGAACGTTT
 GTGGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTGTGGACTATTGGAAAAGGAAGTTCTATT
 GACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAAGTAGAGGGAAAGATAGTTCAAT
 ATGAAAACCTTAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGACCAGCACCA
 GGTGAAAACGAACCACAGAACATGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTC
 CCATTGGAAATCAGTTGACTGACTAGAAGTCCTCACACTGACTGCTCACCTAAA
 CAGGCTGGCTTAATGAGATGGT

>BARCODE33

CGTTTGTTCAGGTCTCTTGAGATGTTGAAGCCCCCGAAGTCCATGGCAGTGGT
 AAGTTTAGAAACCATTGTTTCGTGGACAAGCCATGATTTTTCTTTCATTGTCAATA
 GCACCATCTCATTAAAGTCCAGCCCGTTCTAGGTGAGCAGTCCAGTGTGAGGG
 CTCCGTAGTCAGTCAGCTGTATTTCCGACGTGGAGCTTGAGGTGTTATGGTTG
 CAATTGTTTCATGTTGTGGTCTCGTTTCCACCTGGTGTGCTGGTCCCAGTGTGGACA
 GTGACTATCACTGAATATTTTAAGTTTTTCATATTGAACTATCTTTCCTCTAGTTTT
 GTCACACACTTGAACCTGGCACACGTCAATAGACTTCCCTTTCGAATAGTCCA
 CAGCCATTACCCAGCCTCTGTCCACAAACGTTCCGCGACACACAAAGTTCCG
 GTCTTGTTCCTTCCACCAGTGTAGCCTCTCCTTGTGTTGGACATCTTGAATGGTG
 GTGGTGTGTTGATATTTAGCTTCAATGCACAGTTTGCAGCAAGACGGCAGGTTCCG
 TGACCTCCGTCTTCAAGAGTTCAATGTCCAATGTTGGTTTATTTTTGCCATGGT
 GGTGACGCAGCTTCCATGCTCCAATACCACGTCCACCCACGTTGCTCCTGACA
 GTCCTTCAACGAAGTCTCTGTTGCCTATTCCACGCATCGCATGGCCATTGATGG
 TGTACCAGCATCAGCAAGATGAAAATGATCCCTTTTGAGTGATGGATATTCCT
 ATCACATCACTAAAAAAGCTGTACC

>BARCODE34

TAGGATATTCATCACTCAAAGGATCATTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACC
 ATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTCGTTGAAGGAC
 TGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCAC
 CACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGT
 CACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACCTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACAC
 CACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGAAGAAC
 AAGACGCGAACTTTGTGTGTCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATG
 GCTGTGGACTATTTCGAAAGGAAGTCTATTGACATGTGCCAAGTTCAAGGTGT
 AACAAAACCTAGAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTTAAATATTCAGTGATAG
 TCACTGTCCACACTGGGACCAGCACCAAGGTGGAAAACGAGACCACAGAACATG
 GAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCACGTGCAAATACAGCTGACTGAC
 TACGGAGCCCTCACACTGAACTGCTCACCTAGAACGGGCTGGACTTTAATGAG
 ATGGTGTCTTGACAATGAAAGAAAAATCATCGCTTATCCACAACAATGTTTTCTG
 ACTTACCACCTGCCATGGACTTGGGGGCTTCAACATCTCAACCTGGAACAGC

>BARCODE35

AGCTTTTTTTAGCGCATGCTATAGGAACATCCATCACTCAAAGGGATCATTTC
 ATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGG
 CAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGTGGACGTGGTATT
 GGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACATTGGACA
 TTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACCTGTGC

ATTGAAGCTAAAATATCAAACACCACCACCAATTCAAGATGTCCAACACAAGGA
 GAGGCTACACTGGTGGGAAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTCGCCGAACGTT
 TGTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGTGGACTATTGGAAAGGGAAGTCTATTG
 ACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAAGTAGAGGAAAGATAGTTCAATATG
 AAAACTTAAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGG
 TGGAAAAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAACTCCAC
 GTCGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCTCTCACACTGGACTGCTCACCTA
 GAACGGGCTGACTTTAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAAGAAAATCATGG
 CTTATCCAGCAACAATGGTTTCTCAACTTACCACTGCCATGGACTTCAGGGGCC
 TCAACACCTAAGAGACCTGGAACAGAC

Sequenciamento DENV-2

>BARCODE1

GAATATCAAATAGAGACTTTGTGGAAGGAGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGAC
 ATAGTCCTGGAACATGGAAGCTGTGTGACGACGATGGCAAAAAATAAACCAAC
 ATTGGATTTTGAAGTATAAAAACAGAAGCGAAACATCCCGCCAAACTCTAAGG
 AAGTATTGCATAGAGGCAAAGCTGACCAACACAACAACAGCATCTCGCTGCC
 AACACAAGGAGAACCTCGCCTAAATGAAGAACAGGACAAAAGATTTGTCTGCA
 AACACTCCATGGTAGATAGAGGATGGGGAAATGGGTGCGGATTATTTGGAAAG
 GGAGGTATCGTGACCTGTGCAATGTTACATGCAAAAAGAACATGGAAGGGAA
 AATCGTGCAACCAGAAAAGTTGGAGTACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGG
 GGAAGAGAATGCAGTCGGAAATGACACAGGAAAACATGCAATC

>BARCODE2

CAGCTGCAAAAGTTGGTCTGACCTTGAAGGCTGCTAATAGGGCAAGATAGGTC
 ACGCCCATGCCTATGTCATCCGTGATAGTAGCGCCACCATGACCATCACTCT
 CCCCAAATCTCGAAAGGACATGTTCCCTGTGATCAATGTCACGAAAGAGACTG
 CAACTAGTAATATTGCATGTTTCGTCCCTACTCGGGTTCTAAGCATCTCTTCCA
 GGAACAATGCCATTCCCAAGACTCCTAGTGAGAAGTTGTCAATCTGTCCATGTC
 CGGCTGTGACCAAAGAGTTGACCAAGTTCTCTTCTTTCTTTCAATGGTCTGA
 TTTCCATTCCATACCAGCATCCATCCTCACCTCTATACCTTAGCGGTGGTAATG
 TGCAAGATCGACAGCACCATTCTGTTATGAGTTTTCCAGAAGCAGTAGTTGTT
 TTAAGGAGGGTCTCTATTTCCACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAGTTCTT
 CGCAGAAATCAAAGTCCATCTCAAGCCTGCCTAGATGCCAGGGTCTGCGGTT
 TGTGTATGATAGCCTGGTCTGTAATTGTGTTGTGACACTGGTCTGCAATATC
 TTTGGAATTATCATCTCACTTTCTAGCACTCCATTACTCCAGAGAGTGTGTGACT
 TTGGCCAGTGGCAGCTTTTAACTTCAATAAAAAGAAGCTTTCTCAATCTTCCATGT
 GTCATTGAGTGCCTTTCTATCCAATAACCCATGTCGGCGTGGACGGCTCTGT
 TGTCTTTTATGGCTGCTGACATGAGTTTTGAGTCACAAGATACATCCTGCCTT
 CTTTCAATTTAGCCATATGTTAGTGGTGAATACTCCAAAGCCATAGTCTTCAAC
 CTCTAGTGAGTTCCAAGCTCTATTTGTGTTGGGACATTCTGCTGTTTCGGGGCC
 ATCAATGAGAAAGGTGTGGTTATGAAGCTCTGTGGAGAGCATTTTCGCTTTGCC
 CCATGCTTTCCAAGAGTACTTCAGCTCAGTGGGTTGAGGCCGCAGGGATCGTT
 TTCCTGCCTGCATGATTCTTTGATGTCTCCTGTCATGATAGTCAACTTTACCTC
 ATTTTCTGTTAGAATGTGATTCAGTTCTGGTGTATTTGTTTCCACATCAGATTC
 TCCAGTCTTGTTACTGAGCGGATTCCACAAATGCCTTCTTCATGAGCCTTCTGG
 ATAGCTGAGGCCAGCTTTGAAGGGGATTCTGGTTGGAATTTGTATTGTTCTGTC
 CATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTGCCACATTTCAAGTTCTTTG
 TTTTCCAGCTCA

>BARCODE3

CAGGGGCAGATAGGTCACGCCCATGCCTATGTCATCCGTCATAGTAGCGCCCA
CCATGACCATCACTCTCCCCAAATCTCGAAAGGACATGTTCCCTGTGATCAATG
TCACGAAAGAGACTGCAACTAGTAATATTGCATGTTTCGTCCCTACTCGGGTTC
TAAGCATCTCTCCAGGAACAATGCCATTCCCAAGACTCCTAGTGAGAAGTTGT
CAATCTGTCCATGTCCGGCTGTGACCAAGAGTTGACCAAGTTCTCTTCTTTCT
CTTTCAATGGTCTGATTTCCATTCCATACCAGCATCCATCCTCACCTCTATACCT
TAGCGGTGGT

>BARCODE4

AGCTGCAAAAAGTTGGTCTGACCTTGAAGGCTGCTAATAGGGCAAGATAGGTCA
CGCCCATGCCTATGTCATCCGTCATAGTAGCGCCCACCATGACCATCACTCTC
CCCAAATCTCGAAAGGACATGTTCCCTGTGATCAATGTCACGAAAGAGACTGC
AACTAGTAATATTGCATGTTTCGTCCCTACTCGGGTTC AAGCATCTCTTCCAG
GAACAATGCCATTCCCAAGACTCCTAGTGAGAAGTTGTCAATCTGTCCATGTCC
GGCTGTGACCAAGAGTTGACCAAGTTCTCTTCTTTCTCTTTCAATGGTCTGAT
TTCCATTCCATACCAGCATCCATCCTCACCTCTATACCTTAGCGGTGGTAATGT
GCAAGATCGACAGCACCATTCTGTTATGAGTTTTCCAGAAGCAGTAGTTGTTCT
TAAGGAGGGTCTCTATTTCCACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAGTTCCTTC
GCAGAAATCAAAGTCCATCTCAAGCCTGCCTAGATGCCAGGGTCTGCCGTTT
GTGTATGATAGCCTGGTCTGTAATTGTGTTGTGACACTGGTCTGCAATATTCT
TTTGAATTATCATCTCACTTTCTAGCACTCCATTACTCCAGAGAGTGTGTGACT
TTGGCCAGTGGCAGCTTTTAACTTCAATAAAGGAAGCTTTCTCAATCTTCCATG
TGTCATTGAGTGCGCTTTCTATCCAATAACCCATGTCGGCGTGGACGGCTCTG
TTGTCTTTTATGGCTGCTGACATGAGTTTTGAGTCACAAGATACATCCTGCCTTT
CTTTCAATTTAGCCATATGTTAGTGGTGAATACTCCAAAGCCATAGTCTTCAA
TGAGTTAGTATTTGATCTGCTTTTGTAGT

>BARCODE5

AATACGCCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTGTCAACTGTGCA
GCAGCTGACAAAGAGATTCTCACTTGGAAATGCTACAGGGACGAGGACCACTGA
AACTGTTTATGGCCCTGGTGGCATTCTTTCGTTTCTTAAATCCCGCCAACAG
CAGGGATATTAAGAGATGGGGAACAATCAAAAAATCAAAGGCTATCAATGTCT
TGAGAGGGTTCAGGAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAACATCTTGAACA

>BARCODE6

TTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTGCCACATTT
CAGTTCTTTGTTTTTCCAGCTCACAACGCAACCACTATCGGCCTGCACCATAAC
TCCCAAATACAATGTCACGACTCCCCTAATACTAGTGACAC

>BARCODE7

CAGCTGCAAAAAGTTGGTCTGACCTTGAAGGCTGCTAATAGGGCAAGATAGGTC
ACGCCCATGCCTATGTCATCCGTCATAGTAGCGCCCACCATGACCATCACTCT
CCCCAAATCTCGAAAGGACATGTTCCCTGTGATCAATGTCACGAAAGAGACTG
CAACTAGTAATATTGCATGTTTCGTCCCTACTCGGGTTC AAGCATCTCTTCCA
GGAACAATGCCATTCCCAAGACTCCTAGTGAGAAGTTGTCAATCTGTCCATGTC
CGGCTGTGACCAAGAGTTGACCAAGTTCTCTTCTTTCTCTTTCAATGGTCTGA
TTTCCATTCCATACCAGCATCCATCCTCACCTCTATACCTTAGCGGTGGTAATG
TGCAAGATCGACAGCACCATTCTGTTATGAGTTTTCCAGAAGCAGTAGTTGTTT
TTAAGGAGGGTCTCTATTTCCACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAGTTCCTT
CGCAGAAATCAAAGTCCATCTCAAGCCTGCCTAGATGCCAGGGTCTGCCGTT
TGTGTATGATAGCCTGGTCTGTAATTGTGTTGTGACACTGGTCTGCAATATTC
TTTGAATTATCATCTCACTTTCTAGCACTCCATTACTCCAGAGAGTGTGTGACT
TTGGCCAGTGGCAGCTTTTAACTTCAATAAAGGAAGCTTTCTCAATCTTCCATG
TGTCATTGAGTGCGCTTTCTATCCAATAACCCATGTCGGCGTGGACGGCTCTG
TTGTCTTTTATGGCTGCTGACATGAGTTTTGAGTCACAAGATACATCCTGCCTTT

CTTTCAATTTTCAGCCATATGTTAGTGGTGAATACTCCAAAGCCATAGTCTTCAAC
CTCTAGTGAGTTCCAAGCTCTATTTGTGTTGGGACATTCTGCTTTTGGG

>BARCODE8

AACTTGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTG
CCACATTTTCAGTTCTTTGTTTTTCCAGCTCACAACGCAACCACTATCGGCCTGC
ACCATAACTCCCAAATACAATGTCACGACTCCCCTAATACTAGTGACACAGAC
AGTGAAGTACTACGCGTATTCATTCCCTATCCATGTGATGACGACTCCTATGAGG
ATTTTCATAGTCCATGAAACCCCACTAAAGGCAGCCCCATAGATTGCTCCAAG
ACTTGGTGGAGGGCCTTTCTATAGATGTGAACACTCCTCCCAGGGATCCAAA
ATCCCAAGCTGTGTCACCTAAAATGGCCATTCTCTTCGCTCCTCTCATTGTTGT
CTCAAACATTTGGCCAATAGAGCTTCTTTCTTAAACCAGCTGAGCTTCAGTTG
TCCCGGTTCTACTCCTATGATGATGTAAGTGTCTCCGAATGGAGGTTCTGCTTC
TATGTTGACTGGGCTGTCTTTTCTGTGACAATTGGGTTGACTGTGATCAAGCG
ACCTAAGACATGTCTTTTTTCCAAATCCATTATTTCAAAGGGATCTTGCACGGA
GAACCGTCCCCTTCATATTGTACTCTGATAACTATTGTCCCATGTTGTGTTTCTG
CTATTTCTTTCACAACCTTTGAACTTTCTATACACATGGAATATGACATTCCTTT
GAGCTGTAGTTTGTCCATTCTCAGCCTACATTTAAGATGTCCTGTGAACAATAA
GTTTCTGAAGACATCTGGATTTCCGTGGCCCCCTGTAAGTGTGTGTCATAG
CCCCTTCTTGAGATCCTAGAACAACAACATCCTGTTTCTTTGCATGGGGATTTTT
G

>BARCODE9

TTGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTGCCA
CATTTTCAGTTCTTTGTTTTTCCAGCTCACAACGCAACCACTATCGGCCTGCACC
ATAACCCCCCAAATACAATGTCACGACTCCCCTAATACTAGTGACACAGACAGT
GAAGTACTACGCGTATTCATTCCCTATCCATGTGATGACGACTCCTATGAGGATT
TTCATAGTCCATGAAACCCCACTAAAGGCAGCCCCATAGATTGCTCCAAAGACT
TGGTGGAGGGCCTTTCTATAGATGTGAACACTCCTCCCAGGGATCCAAAATC
CCAAGCTGTGTCACCTAAAATGGCCATTCTCTTCGCTCCTCTCATTGTTGTCTC
AAACATTTGGCCAATAGAGCTTCTTTCTTAAACCAGCTGAGCTTCAGTTGTCC
CGGTTCTACTCCTATAATGATGTAAGTGTCTCCGAATGGAGGTTCTGCTTCTAT
GTTGACTGGGCTGTCTTTTCTGTGACAATTGGGTTGACTGTGATCAAGCGAC
CTAAGACATGTCTTTTTTCCAAATCCATTATTTCAAAGGGATCTTGCACGGAGA
ACCGTCCCCTTCATATTGTAC

>BARCODE10

TTATTCTAGGATCTCAAGAAGGGGCTATGCACACAGCACTTACAGGGGCCACG
GAAATCCAGATGTCTTCAGGAACTTATTGTTTACAGGACATCTTAAATGTAGG
CTGAGAATGGACAAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATATTCCATGTGTATAGGA
AAGTTCAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGGACAATAGTTATC
AGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCGTGCAAGATCCCTTTTGAATAATG
GATTTGGAAAAAAGACATGTCTTAGGTCGCTTGATCACAGTCAACCCAATTGTC
ACAGAAAAGGACAGCCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCCTCCATTTCGGAGACAG
TTACATCATTATAGGAGTAGAACCGGGACAACCTGAAGCTCAGCTGGTTTAAAGAA
AGGAAGCTCTATTGGCCAAATGTTTGAAGACAACAATGAGAGGAGCGAA

>BARCODE11

CCTGCGGCCTCAACCCACTGAGCTGAAGTACTCTTGGAAAGCATGGGGCAAAG
CGAAAATGCTCTCCACAGAGCTTCATAACCACACCTTTCTCATTGATGGCCCCG
AAACAGCAGAATGTCCCAACACAAATAGAGCTTGGAACTCACTAGAGGTTGAA
GACTATGGCTTTGGAGTATTCACCACTAACATATGGCTGAAATTGAAAGAAAGG
CAGGATGTATCTTGTGACTCAAACCTCATGTCAGCAGCCATAAAGACAACATG
TGTCCAGGAAAGTTCAAAGTTGTGAAGGAAATCGCAGAAACACAACATGGAATA
TTATCAGAGTTCAATATGAAGGGAACGGTTCTCCGTGCAAGATCCACCTCTTTG

AAATAATGGATTTGGAAAAAGACATGTCTTAGGTCGCTTGATCACAGTCAACC
 CAATTGTCACAGAAAAGGACAGCCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTC
 GGAGACAGTTACATCATTATAGGAGTAGAACCGGGACAACCTGAAGCTCAGCTG
 GTTTAAGAAAGGAAGCTCTATTGGCCAAATGTTTGAGACAACAATGAGAGGAG
 CGAAGAGAATGGCCATTTTAGGTGACACAGCTTGGGATTTTGGATCCCTGGGA
 GGAGTGTTACATCTATAGGAAAGGCCCTCCACCAAGTCTTTGGAGCAATCTAT
 GGGGCTGCCTTTAGTGGGGTTTCATGGACTATGAAAATC

>BARCODE12

TGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTGCCAC
 ATTTAGTTCCTTTGTTTTCCAGCTCACAACGCAACCACTATCGGCCTGCACCA
 TAACTCCCAAATACAATGTCACGACTCCCCTAATACTAGTGACACAGACAGTG
 AAGTACTACGCGTATTCATTCCATGTGATGACGACTCCTATGAGGATTT
 TCATAGTCCATGAAACCCCACTAAAGGCAGCCCCATAGATTGCTCCAAAGACTT
 GGTGGAGGGCCTTTCTATAGATGTGAACACTCCTCCCAGGGATCCAAATCC
 CAAGCTGTGTCACCTAAAATGGCCATTCTCTTCGCTCCTCTCATTGTTGTCTCA
 AACATTTGGCCAATAGAGCTTCTTTCTTAAACCAGCTGAGCTTCAGTTGTCCC
 GGTTCTACTCCTATAATGATGTAAGTGTCTCCGAATGGAGGTTCTGCTTCTATG
 TTGACTGGGCTGTCTTTTCTGTGACAATTGGGTTGACTGTGATCAAGCGACCT
 AAGACATGTCTTTTTTCCAAATCATTATTTCAAAGGGATCTTGCACGGAGAAC
 CGTCCCCTTCATATTGACTCTGATAACTATTGTCCCATGTTGTGTTTCTGCTAT
 TTCCTTCACAACCTTTGAACTTTCTATACACATGGAATATGACATTCCTTTGAGC
 TGTAGTTTGTCCATTCTCAGCCTACATTTAAGATGTCCTGTAAACAATAAGTTTC
 CTGAAGACATCTGGATTTCCGTGG

>BARCODE13

CCATGCAAAGAAACAGGATGTTGTTGTTCTAGGATCTCAAGAAGGGGCTATGC
 ACACAGCACTTACAGGGGCCACGGAAATCCAGATGTCTTCAGGAACTTATTG
 TTCACAGGACATCTTAAATGTAGGCTGAGAATGGACAAACTACAGCTCAAAGGA
 ATGTCATATTCCATGTGTATAGGAAAGTTCAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAA
 ACACAACATGGGACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCC
 GTGCAAGATCCCTTTTGAATAATGGATTTGGAAAAAAGACATGTCTTAGGTCG
 CTTGATCACAGTCAACCCAATTGTCACAGAAAAGGACAGCCCAGTCAACATAGA
 AGCAGAACCTCCATTCGGAGACAGTTACATCATTATAGGAGTAGAACCGGGAC
 AACTGAAGCTCAGCTGGTTAAGAAAGGAAGCTCTATTGGCCAAATGTTTGAGA
 CAACAATGAGAGGAGCGAAGAGAATGGCCATTTTAGGTGACACAGCTTGGGAT
 TTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTACATCTATAGGAAAGGCCCTCCACCAAGT
 CTTTGGAGCAATCTATGGGGCTGCCTTTAGTGGGGTTTCATGGACTATGAAAAT
 CCTCATAGGAGTCGTCATCACATGGATAGGAATGAATACGCGTAGTACTTCACT
 GTCTGTGTCACTAGTATTAGTGGGAGTCGTGACATTGTATTTGGGGGTTATGGT
 GCAGGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAACAAGAAGTGAATGTG
 GCA

>BARCODE14

ATGCAAAGAAACAGGATGTTGTTGTTCTAGGATCTCAAGAAGGGGCTATGCAC
 ACAGCACTTACAGGGGCCACGGAAATCCAGATGTCTTCAGGAACTTACTGTT
 CACAGGACATCTTAAATGTAGGCTGAGAATGGACAAACTACAGCTCAAAGGAAT
 GTCATATTCCATGTGTATAGGAAAGTTCAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAAC
 ACAACATGGGACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCGT
 GCAAGATCCCTTTTGAATAATGGATTTGGAAAAAAGACATGTCTTAGGTCGCT
 TGATCACAGTCAACCCAATTGTCACAGAAAAGGACAGCCCAGTCAACATAGAA
 GCAGAACCTCCATTCGGAGACAGTTACATCATTATAGGAGTAGAACCGGGACA
 ACTGAAGCTCAGCTGGTTTAAAGAAAGGAAGCTCTATTGGCCAAATGTTTGAGAC
 ACAATGAGAGGAGCGAAGAGAATGGCCATTTTAGGTGACACAGCTTGGGATT

TTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTACATCTATAGGAAAGGCCCTCCACCAAGTC
 TTTGGAGCAATCTATGGGGCTGCCTTTAGTGGGGTTTCATGGACTATGAAAATC
 CTCATAGGAGTCGTCATCACATGGATAGGAATGAATACGCGTAGTACTTCACTG
 TCTGTGTCACTAGTATTAGTGGGAGTCGTGACATTGTATTTGGGAGTTATGGTG
 CAGGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAACAAAGAACTGAAATGTG
 >BARCODE15

TCCACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAGTTCCTTCGCAGAAATCAAAGTCCAT
 CTCAAGCCTGCCTAGATGCCAGGGTCCTGCCGTTTGTGTATGATAGCCTGGTC
 TGTAATTGTGTTGTGACACTGGTCCTGCAATATTCTTTGGAATTATCATCTCACT
 TTCTAGCACTCCATTACTCCAGAGAGTGTGTGACTTTGGCCAGTGGCAGCTTTT
 AACTTCAATAAAAGAAGCTTTCTCAATCTTCATGTGTGATTGAGTGCGCTTTCT
 ATCCAATAACCCATGTCGGCGTGGACGGCTCTGTTGTCTTTTATGGCTGCTGA
 CATGAGTTTTGAGTCACAAGATACATCCTGCCTTTCTTTCAATTCAGCCATATG
 TTAGTGGTGAATACTCCAAAGCCATAGTCTTCAACCTCTAGTGAGTTCCAAGCT
 CTATTTGTGTT

>BARCODE16

GAAGTTGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCT
 GCCACATTTCAAGTCTTTGTTTTCCAGCTCACAACGCAACCACTATCGGCCTG
 CACCATAACTCCCAAATACAATGTCACGACTCCCCTAATACTAGTGACACAGA
 CAGTGAAGTACTACGCGTATTCATTCTATCCATGTGATGACGACTCCTATGAG
 GATTTTCATAGTCCATGAAACCCCACTAAAGGCAGCCCCATAGATTGCTCCAAA
 GACTTGGTGGAGGGCCTTTCTATAGATGTGAACACTCCTCCCAGGGATCCAA
 AATCCCAAGCTGTGTACCTAAAATGGCCATTCTCTTCGCTCCTCTCATTGTTG
 TCTCAAACATTTGGCCAATAGAGCTTCTTTCTTAAACCAGCTGAGCTTCAGTT
 GTCCCGGTTCTACTCCTATAATGATGTAAGTGTCTCCGAATGGAGTTCTGCTT
 CTATGTTGACTGGGCTGTCCTTTTCTGTGACAATTGGGTTGACTGTGATCAAGC
 GACCTAAGACATGTCTTTTTTCCAAATCCATTATTTCAAAGGGATCTTGACCG
 AGAACCGTCCCCTTCATATTGACTCTGATAACTATTGTCCCATGTTGTGTTTCT
 GCTATTTCTTCAAACTTTGAACTTTCTATACACATGGAATATGACATTCCTT
 TGA

>BARCODE17

ATGTCCTGTAACAATAAGTTTCTGAAGACATCTGGATTTCCGTGGCCCCTGT
 AAGTGCTGTGTGCATAGCCCCTTCTTGAGATCCTAGAACAAACAACATCCTGTTT
 CTTTGCATGGGGATTTTTGAAAGTGACCAATGTCTCTTTCTGTATCCAATTTGAT
 CTTGTATGTCTGCTCCGGGCAGCCATGGTAATGGCAGGTCTAAGAACCATTG
 CCTATGCACCAGCCAAGCCTTGTTCATTTGCAGCAACACCATCTCATTGAA
 GTCGAGTCCCGTTCTCGGAGAGCATTCCATCGTGACAGTCGCCATAGCCTGAC
 TTCGTTCTGCCTCTGTAATGGAAGTCTGTGGTGTATTTTAATTTCTTGCCGTG
 TTTTCTGTGTCATTTCCGACTGCATTCTCTTCCCTGAGTGAGGTGTTATCACAA
 TGGTGTACTCCAAGTTTTCTGGTTGCACGCTTTTTCTTCCATGTTCTTTTTGCA
 TGTGAACATTGCACAGGTCACGATACCTCCCTTTCCAAATAATCCGCACCCATT
 TCCCATCCTCTTCTACCATGGAGTGTGTCAGACAAATCTTTGTCTGTTCTT
 CATTAGGCTAGGCATTCTCCTTGTGTTGGGCAGCAGAGATGCTGTTGTTGTG
 TGGTCAGCTTTCTCTTTGCCATACTTCCCTAGAGTACTTCAGCTCGGGATGT
 TAGGTGCGAGTTCTGTTTTATCAGTTCAAATCCAATGTTGGTTTATTTTTGC
 CATCGTCGTCACAACAGCTTCCATGTTCCAGGACTATGTAACCCAGCTTCTCCT
 TGTTATTTGTTTCCACATCAGATTCTCCAGTCTTGTTACTGAGCGGATTCCACAA
 ATGCCTTCTTCATGAGCCTTCTGGATAGCTGAGGCCAGC

>BARCODE18

AACAAAGAACTGAAATGTGGCAGTGGGATCTTTATCACAGACAACGTGCACAC
 ATGGACAGAACAATAAAATCCAACCAGAATCCCCTTCAAAGCTGGCCTCAGC

TATCCAGAAGGCTCATGAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAACAAGAC
 TGGAGAATCTGATGTGGAAACAAATAACACCAGAACTGAATCACATTCTAACAG
 AAAATGAGGTAAAGTTGACTATCATGACAGGAGACATTAAGGAATCATGCAGG
 CAGGAAAACGATCCCTGCGGCCTCAACCCACTGAGCTGAAGTACTCTTGAAA
 GCATGGGGCAAAGCGAAAATGCTCTCCACAGAGCTTCATAACACACCTTTCT
 CATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAATGTCCCAACACAAATAGAGCTTGAACT
 CACTAG

>BARCODE19

TGGAACCTTGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCA
 CTGCCACATTTTCAGTTCTTTGTTTTCCAGCTCACAAACGCAACCACTATCGGCC
 TGCACCATAACTCCCAAATACAATGTCACGACTCCCACTAATACTAGTGACACA
 GACAGTGAAGTACTACGCGTATTCATTCTATCCATGTGATGACGACTCCTATG
 AGGATTTTCATAGTCCATGAAACCCCACTAAAGGCAGCCCCATAGATTGCTCCA
 AAGACTTGGTGGAGGGCCTTTCTATAGATGTGAACACTCCTCCAGGGATCC
 AAAATCCCAAGCTGTGTCACCTAAAATGGCCATTCTCTTCGCTCCTCTCATTGT
 TGTCTCAAACATTTGGCCAATAGAGCTTCCTTTCTTAAACCAGCTGAGCTTCAG
 TTGTCCCGTTCTACTCCTATAATGATGTAAGTGTCTCCGAATGGAGGTTCTGC
 TTCTATGTTGACTGGGCTGTCCTTTTCTGTGACAATTGGATTGACTGTGATCAA
 GCGACCTAAGACATGTCTTTTTTCCAATCCATTATTTCAAAGGGATCTTGAC
 GGAGAACCGTCCCCTTCATATTGACTCTGATAACTATTGTCCCATGTTGTGTT
 CTGCTATTTCTTCACAACCTTTGAACTTTCTATACACATGGAATATGACATTCC
 TT

>BARCODE20

CAGCTGCAAAAGTTGGTCTGACCTTGAAGGCTGCTAATAGGGCAAGATAGGTC
 ACGCCCATGCCTATGTCATCCGTATAGTAGCGCCACCATGACCATCACTCT
 CCCCAAATCTCGAAAGGACATGTTCCCTGTGATCAATGTCACGAAAGAGACTG
 CAACTAGTAATATTGCATGTTTCGTCCCTACTCGGGTTCTAAGCATCTCTTCCA
 GGAACAATGCCATTCCCAAGACTCCTAGTGAGAAGTTGTCAATCTGTCCATGTC
 CGGCTGTGACCAAAGAGTTGACCAAGTTCTCTTCTTTCTTTCAATGGTCTGA
 TTTCCATTCCATACCAGCATCCATCCTCACCTCTATACCTTAGCGGTGGTAATG
 TGCAAGATCGACAGCACCATTCTGTTATGAGTTTTCCAGAAGCAGTAGTTGTT
 TTAAGGAGGGTCTCTATTTCCACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAGTTCTT
 CGCAGAAATCAAAGTCCATCTCAAGCCTGCCTAGATGCCAGGGTCTGCCGTT
 TGTGTATGATAGCCTGGTCTGTAATTGTGTTGTGACACTGGTCTGCAATATC
 TTTGGAATTATCATCTCACTTTCTAGCACTCCATTACTCCAGAGAGTGTGTGACT
 TTGGCCAGTGGCAGCTTTTAACTTCAATAAAGGAAGCTTTCTCAATCTTCCATG
 TGTCAATTGAGTGCCTTTCTATCCAATAACCCATGTCGGCGTGGACGGCTCTG
 TTGTCTTTTATGGCTGCTGACATGAGTTTTGAGTCACAAGATACATCCTGCCTT
 CTTTCAATTTTCAAGCATATGTTAGTGGTGAATACTCCAAAGCCATAGTCTTCAAC
 CTCTAGTGAGTTCCAAGCTCTATTTGTGTTGGGACATTCTGCTGTTTCGGGGCC
 ATCAATGAGAAAGGTGTGGTTATGAAGCTCTGTGGAGAGCATTTCGCTTTGCC
 CCATGCTTTCCAAGAGTACTTCAGCTCAGTGGGTTGAGGCCGCAGGGATCGTT
 TTCCTGCCTGCATGATTCTTTAATGTCTCCTGTGATGATAGTCAACTTTACCTC
 ATTTTCTGTTAGAATGTGATTCAGTTCTGGTGTATTGTTTCCACATCAGATTC
 TCCAGTCTTGTTACTGAGCGGATTCCACAAATGCCTTCTTCATGAGCCTTCTTG
 ATAGCTGAGGCCAGCTTTGAAGGGGATTCTGGTTGGAATTTGTATTGTTCTGTC
 CATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTGCCACATTTTCAGTTCTTTG
 TTTTCCAGC

>BARCODE21

GTGGCAGTGGGATTTTTATCACAGACAACGTGCACACATGGACAGAACAATAC
 AAATCCAACCAGAATCCCCTTCAAAGCTGGCCTCAGCTATCCAGAAGGCTCAT

GAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAACAAGACTGGAGAATCTGATGTG
 GAAACAAATAACACCAGAACTGAATCACATTCTAACAGAAAATGAGGTAAAGTT
 GACCATCATGACAGGAGACATTAAGGAATCATGCAGGCAGGAAAACGATCCC
 TGCGGCCTCAACCCACTGAGCTGAAGTACTCTTGAAAGCATGGGGCAAAGC
 GAAAATGCTCTCCACAGAGCTTCATAACCCACACCTTTCTCATTGATGGCCCCGA
 AACAGCAGAATGTCCCAACACAAATAGAGCTTGAACTCACTAGAGGTTGAAG
 ACTATGGCTTTGGAGTATTCACCACTAACATATGGCTGAAATTGAAAGAAAGGC
 AGGATGTATCTTGTGACTCAAACTCATGTGAGCAGCCATAAAAGACAACAAAG
 CCGTCCACGCCGACATGGGTTATTGGATAGAAAGCGCACTCAATGACACATGG
 AAGATTGAGAAAGCTTCCTTTATTGAAGTTAAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCA
 CACACTCTCTGGAGTAATGGAGTGCTAGAAAGTGAGATGATAATCCAAAGAAT
 ATGCAGGACCAGTGTCAACACAATTACAGACCAGGCTATCATAACACAAACG
 GCAGGACCCTGGCATCTAGGCAGGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTGCGAAGG
 AACTACAGTGGTGGTGAAGACTGTGGAAATAGAGGACCCTCCTTAAGAA
 CAACTACTGCTTCTGGAAAACCTATAACAGAATGGTGTCTGTCGATCTTGACAT
 TACCACCGCTAAGGTATAGAGGTGAGGATGGATGCTGGTATGGAATGGAAATC
 AGACCATTGAAAGAGAAAGAAGAGAAGACTTGGTCAACTCTTTGGTACAGCCGG
 ACATGGACAGGTTGACAACCTTCTCACTAGGAGTCTTGGGAATGGCATTGTTCT
 GGAAGAGATGCTTAGAACCCGAGTAGGGACGAAACATGCAATATTACTAGTTG
 CAGTCTCTTTCTGACATTGATCACAGGGAACATGTCCTTTGAGATTTGGGGA
 GAGTGATGGTCATGGTGGGCGCTACTATGACGGATGACATAGGCATGGGCGT
 GACCTATCTTGCCCTATTAGCAGCCTTTAAGATCAGACCAACTTTTGCAGCTGG
 A

>BARCODE22

TGTTATGAGTTTTCCAGAAGCAGTAGTTGTTCTTAAGGAGGGTCTCTATTTCC
 ACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAGTTCCTTCGCAGAAATCAAAGTCCATCTC
 AAGCCTGCCTAGATGCCAAGGTCTGCCGTTTGTGTATGATAGCCTGGTCTGT
 AATTGTGTTGTGACACTGGTCTGCAATATTCTTTGGAATTATCATCTCACTTTC
 TAGCACTCCATTACTCCAGAGAGTGTGTGACTTTGGCCAGTGGCAGCTTTAAC
 TTCAATAAAGGAAGCTTTCTCAATCTTCCATGTGTGATTGAGTGCCTTTCTATC
 CAATAACCCATGTCCGGCGTGGACGGCTCTGTTGTCTTTTATGGCTGCTGACAT
 GAGTTTTGAGTCACAAGATACATCCTGCCTTTCTTTCAATTTACGCCATATGTTA
 GTGGTGAATACTCCAAAGCCATAGTCTTCAACCTCTAGTGAGTTCCAAGCTCTA
 TTTGTGTTGGGACATTCTGCTGTTTCGGGGCCATCAATGAGAAAGGTGTGGTTA
 TGAAGCTCTGTGGAGAGCATTTTCGCTTTGCCCATGCTTTCCAAGAGTACTTC
 AGCTCAGTGGGTTGAGGCCGACGGGATCGTTTTCTGCCTGCATGATTCCTTT
 AATGTCTCCTGTCATGATAGTCAACTTTACCTCATTCTTTCTGTTAGAATGTGATTC
 AATTCTGGTGTATTTGTTTCCACATCAGATTCTCCAGTCTTGTTACTGAGCGGA
 TTCCACAAATGCCTTCTTTCATGAGCCTTCTGGATAGCTGAGGCCAGCTTTGAAG
 GGGATTCTGGTTGGAATTTGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGA
 TAAAGATCCCCTGCCACATTTAGTTCCTTTGTTTTTCCAGCTC

>BARCODE23

AAAATCCCCATGCAAAGAAACAGGATGTTGTTGTTCTAGGATCTCAAGAAGGG
 GCTATGCACACAGCACTTACAGGGGCCACGAAATCCAGATGTCTTCAGGAAA
 CTTATTGTTACAGGACATCTTAAATGTAGGCTGAGAATGGACAACTACAGCT
 CAAAGGAATGTCATATCCATGTGTATAGGAAAGTTCAAAGTTGTGAAGGAAAT
 AGCAGAAACACAACATGGGACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACG
 GTTCTCCGTGCAAGATCCCTTTTGAATAATGGATTTGGAAAAAAGACATGTCT
 TAGGTGCTTGATCACAGTCAACCCAATTGTCACAGAAAAGGACAGCCCAGTC
 AACATAGAAGCAGAACCTCCATTCGGAGACAGTTACATCATTATAGGAGTAGAA
 CCGGGACAACCTGAAGCTCAGCTGGTTAAGAAAGGAAGCTCTATTGGCCAAAT

GTTTGAGACAACAATGAGAGGAGCGAAGAGAATGGCCATTTTAGGTGACACAG
CTTGGGATTTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTACATCTATAGGAAAGGCCCTC
CACCAAGTCTTTGGAGCAATCTATGGGGCTGCCTTAGTGGGGTTTCATGGACT
ATGAAAATCCTCATAGGAGTCGTCATCACATGGATAGGAATGAATACGCGTAGT
ACTTCACTGTCTGTGTCAGTATTAGTG

>BARCODE24

TTGTATTGTTCTGTCCATGTGTGCACGTTGTCTGTGATAAAGATCCCCTGCCA
CATTTCAAGTTCTTTGTTTTCCAGCTCACAAACGCAACCACTATCGGCCTGCACC
ATAACTCCCAAATAACAATGTCACGACTCCCCTAATACTAGTGACACAGACAGT
GAAGTACTACGCGTATTCATTCTATCCATGTGATGACGACTCCTATGAGGATT
TTCATAGTCCATGAAACCCCACTAAAGGCAGCCCCATAGATTGCTCCAAAGACT
TGGTGGAGGGCCTTTCTATAGATGTGAACACTCCTCCCAGGGATCCAAAATC
CCAAGCTGTGTCACCTAAAATGGCCATTCTCTTCGCTCCTCTCATTGTTGTCTC
AAACATTTGGCCAATAGAGCTTCTTTCTTAAACCAGCTGAGCTTCAGTTGTCC
CGGTTCTACTCCTATAATGATGTAAGTGTCTCCGAATGGAGGTTCTGCTTCTAT
GTTGACTGGGCTGTCTTTTCTGTGACAATTGGGTTGACTGTGATCAAGCGAC
CTAAGACATGTCTTTTTTCCAAATCCATTATTTCAAAGGGATCTTGCACGGAGA
ACCGTCCCCTTCATATTGACTCTGATAACTATTGTCCCATGTTGTGTTTCTGCT
ATTTCTTCACAACCTTTGAACTTTCTATACACATGGAATATGACATTCCTTTGA
GCTGTAGTTTGTCCATTCTCAGCCTACATTTGAGATGTCCTGTGAACAATAAGT
TTCCTGAAGACATCTGGATTTCCGTGGCCCCTGTAAGTGCTGTGTGCATAGCC
CCTTCTTGAGATCCTAGAACAACAACATCCTGTTTCTTTGCATGGGGATTTTTGA
AAGTGACCAATGTCTCTTTCTGTATCCAATTTGATCCTTGTATGTCTGCTCCGG
GCAGCCATGGTAATGGCAGGTCTAAGAACCATTGCCTATGCACCAGCCAAGCC
TTGTTTTCCATTTGCAGCAACACCATCTCATTGAAGTCGAGTCCCGTTCTCGGA
GAGCATTCCATCGTGACAGTGCCATAGCCTGTTAGTTCTGCCTCTGTAATGGAA
CTCTGTGGTGTTATTTAATTTCTTGGCGTGTTTTCTGTGTCATTTCCGACTG
CATTCTTTCCCCTGAGTGAGGTGTTATCACAATGGTGTACTCCAAGTTTTCTG
GTTGCACGATTTTCCCTTCCATGTTCTTTTTGCATGTGAACATTGCACAGGTCA
CGATACCTCCCTTTCAAATAATCCGCACCCATTTCCCCTATCTATCTACCAT
GGAGTGTTTGCAGACAAATCTTTTGTCTGTTCTTCAATTTAGGCTAGGTTCTCCT
TGTGTTGGGCAGCGAGATGCTGTTGTTGTTGGTCAGCTTTGCCTCTATGCA
ATACTTCTTAGAGTGGCGGGATGTTTTCGCTTCTGTTTTTATCAGTTCAAATCC
AATGTTGGTTATTTTTAGCCATCGTCGTCACACAGCTTCCATGTTCCAGGACT
ATGTCAACCCAGCTTCTCCTGAAACTCCTTCCACAAAGTCTCTATTTGATATTC
CTATACAACGCATTGT

>BARCODE25

ATAGGTCACGCCCATGCCTATGTCATCCGTCATAGTAGCGCCACCATGACCA
TCACTCTCCCAAATCTCGAAAGGACATGTTCCCTGTGATCAATGTCACGAAAG
AGACTGCAACTAGTAATATTGCATGTTTCGTCCCTACTCGGGTTCTAAGCATCT
CTTCCAGGAACAATGCCATTCCAAGACTCCTAGTGAGAAGTTGTCAATCTGTC
CATGTCCGGCTGTGACCAAAGAGTTGACCAAGTTCTTCTTTCTTTCAATG
GTCTGATTTCCATTCCATACCAGCATCCATCCTCACCTCTATACCTTAGCGGTG
GTAATGTGCAAGATCGACAGCACCATTCTGTTATGAGTTTTCCAGAAGCAGTAG
TTGTTCTTAAGGAGGGTCCCTCTATTTCCACAGTCTTCAGTCACCACCACTGTAG
TTCCTTTCGCAGAAATCAAAGTCCATCTCAAGCCTGCCTAGATGCCAGGGTCT
GCCGTTTGTGATGATAGCCTGGTCTGTAATTGTGTTGTGACACTGGTCTGCA
ATATTCTTTGGAATTATCATCTCACTTTCTAGCACTCCATTACT

APÊNDICE C – DADOS DE SEQUENCIAMENTO E GENOTIPAGEM

Este apêndice é composto pelo arquivo externo [Dados do Sequenciamento e Genotipagem], anexo a este documento.

[Clique Aqui para abrir o Apêndice C.](#)

ARTICLE

TITLE: Serotype Determination and Phylogenetic Analysis of Dengue Virus Circulating in the Federal District, Brazil, During the 2022 and 2024 Epidemics

RUNNING TITLE: DENV Serotypes and Phylogeny in the Federal District

AUTHORS: Alicia Cavalcante Maia ^{1,2,3}, Lorena Aparecida Gonçalves de Noronha^{1,3}, Kaio José dos Santos Silva³, Pâmela, Maria de Oliveira^{1,2}, Évelin Mota Cassemiro^{1,2}, Tatyane de Souza Cardoso Quintão^{1,2}, Svetoslav Nanev Slavov⁴, Wildo Navegantes de Araújo¹, Alex Leite Pereira^{1,3}, Rodrigo Haddad^{1,2,*}

AFFILIATIONS:

1. Center for Tropical Medicine, University of Brasilia, Federal District, Brazil
2. Molecular Diagnostics Laboratory, University Hospital of Brasilia/EBSERH, Federal District, Brazil
3. Microorganism Laboratory, Faculty of Health Sciences and Technologies, University of Brasilia, Federal District, Brazil
4. Butantan Institute, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Campus Universitário - Centro Metropolitano, Ceilândia Sul

Brasília - DF. CEP: 72220-275

Telephone: +55 61 3107-8437

E-mail: haddad@unb.br

ABSTRACT:

Dengue is an arboviral disease of great importance to public health, caused by the dengue virus (DENV), which comprises four genetically distinct serotypes. In Brazil, the co-circulation of multiple serotypes and genotypes sustains a hyperendemic scenario, particularly in the Federal District, which suffered its largest epidemic in 2024, after a change in the predominant serotype. This study aimed to analyze the phylogenetic relationships of dengue viruses that circulated during the 2022 and 2024 epidemics in the Federal District. Clinical samples positive for DENV were serotyped by real-time RT-PCR, and DENV-1 and DENV-2 samples were selected for partial genomic sequencing using the MinION platform. DENV genotyping was

performed with Genome Detective, and phylogenetic analyses used the NextClade pipeline. In 2022, DENV-1 was almost exclusively predominant (97.6%), while in 2024, co-circulation occurred with a predominance of DENV-2 (53.7%). DENV-1 samples were consistently grouped into Genotype V, while DENV-2 samples were predominantly concentrated in Genotype II (Cosmopolitan). Nucleotide similarity analyses for both serotypes showed proximity to Brazilian and international isolates. In conclusion, molecular characterization revealed a change in the viral circulation profile in the Federal District between 2022 and 2024, with DENV-2 predominating in the most recent period. While DENV-1 samples remained in Genotype V, DENV-2 samples were classified as Genotype II (Cosmopolitan). The findings reinforce the potential of genomic surveillance to detect changes in the circulation dynamics of DENV.

Introduction

Dengue fever (DF) represents one of the most significant arboviral diseases globally, with an estimated 390 million infections occurring annually and at least 25,000 deaths attributed to the disease [1]. The etiological agent, dengue virus (DENV), belongs to the *Flaviviridae* family and comprises four genetically distinct serotypes designated as DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 [2]. These serotypes are primarily transmitted to humans through the bite of infected female *Aedes* mosquitoes, particularly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* [3]. The global burden of dengue has increased dramatically over recent decades, with the disease now endemic in tropical and subtropical regions worldwide, affecting more than 100 countries across Africa, the Americas, Asia, and the Western Pacific [4].

Brazil has emerged as the country with the highest number of reported dengue cases globally, representing a major public health challenge [5]. Despite extensive surveillance efforts across Brazil, significant gaps remain in understanding the temporal and spatial dynamics of dengue serotype circulation at the local level, particularly in the Federal District. The Federal District, which encompasses Brazil's capital Brasília and surrounding areas, represents a unique epidemiological setting characterized by high population

density, substantial internal and external mobility, and distinct climatic patterns that influence vector dynamics. Recent years have witnessed major dengue epidemics in 2022 and 2024, yet comprehensive molecular characterization of the circulating serotypes during these epidemic periods remains limited. Understanding the specific serotypes responsible for these epidemics is crucial for several reasons: different serotypes are associated with varying degrees of disease severity and clinical manifestations, which has direct implications for clinical management and healthcare resource allocation [6], [7], [8]; the sequential introduction of different serotypes or the co-circulation of multiple serotypes can increase the risk of severe disease through antibody-dependent enhancement in individuals with prior dengue exposure [9], [10]; and knowledge of circulating serotypes and their genetic characteristics can inform public health preparedness strategies and guide the development and implementation of serotype-specific interventions, including potential vaccine strategies [11], [12].

Therefore, the aim of this study is to evaluate the subtypes (serotypes) of dengue virus that circulated in the Federal District of Brazil during the 2022 and 2024 epidemics. Through molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue virus isolates from these epidemic periods, this study will contribute to a more comprehensive understanding of dengue epidemiology in the Federal District and provide critical data to support evidence-based public health decision-making for dengue prevention and control in this important Brazilian region.

Material and Methods

Sample Collection

Samples from the 2022 epidemic were collected from patients of the Unified Health System (SUS) residing in Administrative Region XXV SCIA/Estrutural, Federal District, Brazil, who sought care at UBS Vila Estrutural presenting acute febrile illness or reporting fever within the previous three days, accompanied by at least two viral infection-associated symptoms (e.g., headache, myalgia, asthenia, vomiting, nausea, diarrhea, arthralgia).

Samples were collected after presentation and acceptance of the Informed Consent Form. The project was approved by the Human Research Ethics Committee (C.A.A.E. 39866620.4.0000.5558). Following collection, samples were transported under controlled temperature to the Molecular Diagnostics Laboratory of the University Hospital of Brasília (LDM-HUB), where viral RNA was extracted and stored at -80°C until analysis.

Samples from the 2024 epidemic were obtained directly from the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF), which provided a randomized set of dengue-positive samples previously used for diagnostic purposes. Samples were transported under controlled temperature to LDM-HUB and stored at -80°C until analysis.

RNA Extraction

Viral RNA extraction was performed using the Extracta® Kit Fast - DNA and RNA viral (MVXA-P016 FAST, Loccus™) on the automated extraction platform EXTRACTA® 32 (Loccus™), following manufacturer's instructions. Extracted samples were stored at -80°C until serotype determination and genome sequencing protocols.

Serotype Determination by Real-Time RT-PCR

Dengue virus serotype detection (serotypes 1, 2, 3, and 4) was performed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using the ZDC Biomol kit (Zika, Dengue, and Chikungunya), developed by the Molecular Biology Institute of Paraná (IBMP), following manufacturer's instructions. The final reaction volume was 20 μL , comprising 10.5 μL of master mix and 9.5 μL of extracted RNA. Master mixes were prepared separately in two microtubes labeled "DEN 1/4" and "DEN 2/3", each containing PCR mix, specific primer sets, specific probe sets, reverse transcriptase enzyme, and RNase-free water, following manufacturer's instructions. Reagent volumes were adjusted according to the number of reactions (minimum 1, maximum 96 reactions, with up to 48 reactions per target set). Reactions were performed in 96-well PCR plates, separated by target, with two wells for positive and negative controls. The QuantStudio™ 5

real-time PCR platform (Applied Biosystems®) was used following the cycling conditions recommended in the ZDC Biomol kit (IBMP).

Dengue Virus Sequencing Protocol

The sequencing protocol was performed in the following steps: Reverse transcriptase reaction (RT); Amplification of the genomic region of interest by Multiplex Tiling PCR; Purification and quantification of the library; Preparation of the library, following the specific protocol for the MinION platform; Loading of the library onto the MinION platform.

RT-PCR Reaction for cDNA synthesis

Prior to RT-PCR, RNA denaturation was performed in the presence of Random Primers (Promega®) for DENV-1 or specific sequencing primers for DENV-2. The denaturation reaction (65°C for 5 minutes followed by immediate ice incubation) used 6 µL of extracted RNA and 1 µL of random primers (DENV-1) or specific primer pool (DENV-2), both diluted 1:2 with RNase-free water. The RT-PCR mix was prepared according to M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus kit (Promega®) recommendations, containing: MLV-RT 5X Buffer (Promega®), dNTP Solution Mix (Amersham™ Cytiva) prepared at 10 mM each, MLV-RT enzyme (Promega®), and RNase-free water, following manufacturer's instructions. The final reaction volume was 20 µL. Reactions were performed in a 2720 Thermal Cycler™ (Applied Biosystems®) using the following cycling program: 25°C for 5 minutes, 50°C for 50 minutes, and 80°C for 10 minutes. Reactions were stored at 3-8°C.

Multiplex Tiling PCR Amplification

Multiplex Tiling PCR is a PCR variant designed to synthesize overlapping amplicons. Pool A and B reactions were performed separately for DENV-1 and DENV-2. Amplifications were confirmed by agarose gel electrophoresis followed by visual inspection under UV transillumination (Diamond™ Nucleic Acid Dye, Promega®).

Primers

The sequencing protocol comprised the following steps: reverse transcription (RT) reaction; genomic region amplification by Multiplex Tiling PCR; genetic material purification; amplified cDNA library preparation following the MinION platform-specific protocol; and library loading onto the MinION platform. The primers for sequencing were synthesized by Exxtend, with sequences derived from the CADDE project (Brazil-UK Centre for Arbovirus Discovery, Diagnosis, Genomics and Epidemiology) primer set designed for complete DENV genome sequencing. For partial genome sequencing, primers were selected to amplify genomic loci at positions 134::4241 for DENV-1 (RefSeq NC_001477) and 85::4420 for DENV-2 (RefSeq NC_001474.2).

Primer identity analysis with reference sequences was performed using the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool) hosted at NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The BLASTn tool identifies regions of local similarity between biological sequences. Primers were divided into pools (A and B) for Multiplex Tiling PCR, a PCR variant using multiple primer pairs to create overlapping amplicons covering the entire genomic region of interest.

Primer Pool Preparation

Each lyophilized primer was reconstituted to a stock concentration of 200 μ M. Primer pools (A and B) were prepared at 10 μ M concentration. Pool A contained primers 1, 3, and 5 (forward and reverse), while Pool B contained primers 2, 4, and 6 (forward and reverse) for both DENV-1 and DENV-2.

DENV-1 Amplification

Multiplex Tiling PCR reactions for DENV-1 (with primer pool A or B) were tested using two different reaction mixes (Mix 1 and 2) with varying primer concentrations (1.0 or 2.4 μ l). Reaction mixes followed Taq DNA Polymerase™ kit (Sigma-Aldrich®) recommendations, containing: 10X Buffer + MgCl₂ (Sigma-Aldrich®), dNTP Solution Mix (Amersham™ Cytiva) at 10 mM each, Taq DNA Polymerase™ enzyme (Sigma-Aldrich®), primer pool (A or B) at 10 mM each (Exxtend), and RNase-free water. Primer concentration variations between pools A and B were implemented as an optimization strategy. Amplification reactions were performed in a 2720 Thermal Cycler™

(Applied Biosystems®) using the cycling parameters: initial denaturation step at 94°C for 30 seconds, followed by 30 cycles of amplification consisting of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute and 30 seconds. A final extension was conducted at 72°C for 5 minutes. After thermocycling, samples were stored at 3-8°C until amplification confirmation by 1.5% agarose gel electrophoresis.

DENV-2 Amplification

Multiplex Tiling PCR reactions for DENV-2 were tested using two different reaction mixes (Mix 1 and 2) with varying primer concentrations (1.0 or 2.0 ul). Both mixes followed Pfu DNA Polymerase™ kit (Promega®) recommendations, containing: 10X Buffer + MgSO₄ (Promega®), dNTP Solution Mix (Amersham™ Cytiva) at 10 mM each, Pfu DNA Polymerase™ enzyme (Promega®), primer pool (A or B) at 10 mM each (Exxtend), and RNase-free water. Primer concentration variations were implemented as an optimization strategy; samples that failed to amplify with Mix 1 were tested with Mix 2, and vice versa. Amplification reactions were performed in a 2720 Thermal Cycler™ (Applied Biosystems®) using the cycling parameters: initial denaturation step at 95°C for 1 minute, followed by 30 cycles of amplification consisting of 95°C for 45 seconds, 55°C for 1 minute and 73°C for 4 minutes. A final extension was conducted at 73°C for 5 minutes. After thermocycling, samples were stored at 3-8°C until amplification confirmation by 1.5% agarose gel electrophoresis.

Library Purification and Quantification

Sequencing libraries were purified using silica/cellulose microcolumn chromatography (ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System A2893; Promega®) according to manufacturer's recommendations. Following purification, library quantification was performed using a NanoDrop™ One UV/VIS spectrophotometer (Thermo Scientific™) according to equipment recommendations. One microliter of RNase-free water was used as blank and 1 µL of purified sample was analyzed. Purity level measured by A260/A280 absorbance ratio and dsDNA quantity in ng/µL were recorded. Samples were stored at -80°C until DNA library preparation for sequencing.

Library Preparation and Loading

Sequencing was performed on a MinION™ Mk1D next-generation sequencing (NGS) platform (Oxford Nanopore Technologies®). Library preparation used the Rapid Sequencing gDNA - Barcoding™ kit (SQK-RBK110.96, Oxford Nanopore Technology®) for DENV-1 and the Rapid Sequencing DNA V14 - Barcoding™ kit (SQK-RBK114.96, Oxford Nanopore Technology®) for DENV-2, following manufacturer's instructions with minor adaptations. Library loading was performed on FLO-MIN114™ flow cells following manufacturer's instructions. After sequencing, read data were analyzed using the Epi2me Desktop platform (Nanoporetech™) for consensus sequence assembly, utilizing the haploid amplicon sequencing data analysis workflow (wf-amplicon), applying standard quality parameters with minor adjustments for result optimization.

Data Analysis

Phylogenetic Analysis and Dendrogram Construction

DENV genotyping was performed using Genome Detective software (Dengue Typing Tool; versions 2.104 and 4.4), with validation of sequence clustering through local alignment in BLASTn. Phylogenetic analyses were conducted using the NextClade pipeline, which automatically aligns sequences to the reference genome and positions samples in a reference phylogeny previously constructed with global genomes representative of viral diversity. The reference phylogenetic tree was inferred by the IQ-TREE algorithm under the maximum likelihood criterion, with automatic selection of the nucleotide substitution model by ModelFinder. The phylogenetic positioning of the sequences was determined by maximizing the similarity of shared mutations at informative sites, with regions without coverage treated as missing data in order to reduce biases in the estimation of phylogenetic distances.

Results

A total of 94 clinical samples positive for dengue virus (DENV) were analyzed, 41 from the 2022 epidemic and 53 from the 2024 epidemic, all from the Federal District. Serotype confirmation by real-time RT-PCR was obtained

for all samples except two from 2024 that did not amplify. In 2022, DENV-1 was predominant (40/41; 97.6%), with only one sample of DENV-2 (2.4%). In 2024, there was co-circulation of DENV-1 (22/53; 41.5%) and DENV-2 (29/53; 54.7%), indicating a change in the viral circulation profile in the Federal District.

The positive samples were subjected to amplification by Multiplex Tiling PCR, with success in 36/62 samples of DENV-1 ($\approx 58\%$) and 25/30 of DENV-2 ($\approx 83\%$), which proceeded to library preparation and sequencing on the MinION platform.

The 36 DENV-1 and 25 DENV-2 libraries were analyzed in Epi2me (wf-amplicon workflow) to assemble consensus sequences. Three DENV-1 samples did not have sufficient reads to generate consensus. The DENV-1 sequences had a mean Qscore of $\sim 7.0 \pm 0.32$, with low coverage depth, while those of DENV-2 performed better, with a mean Qscore of $\sim 14.0 \pm 0.47$ and depths often exceeding 1,000 \times (Tables S1 and S2).

In genotyping, all DENV-1 sequences from the 2022 and 2024 epidemics in the Federal District were classified as Genotype V, showing high similarity to sequences previously described in Brazil and other countries in the Americas (Table S3). The DENV-2 sequences, all from the 2024 epidemic, were classified as Genotype II (Cosmopolitan), sublineage II_F.1.1.2, with high genetic similarity to sequences recently deposited in the database, mainly from other Brazilian states and international contexts (Table S4).

The sequences from the 2022 and 2024 epidemics in the Federal District were aligned with the reference genome sequence and incorporated into the global phylogeny, without altering the tree topology. The phylogenetic positioning of the DENV-1 sequences is shown in Figure 1.

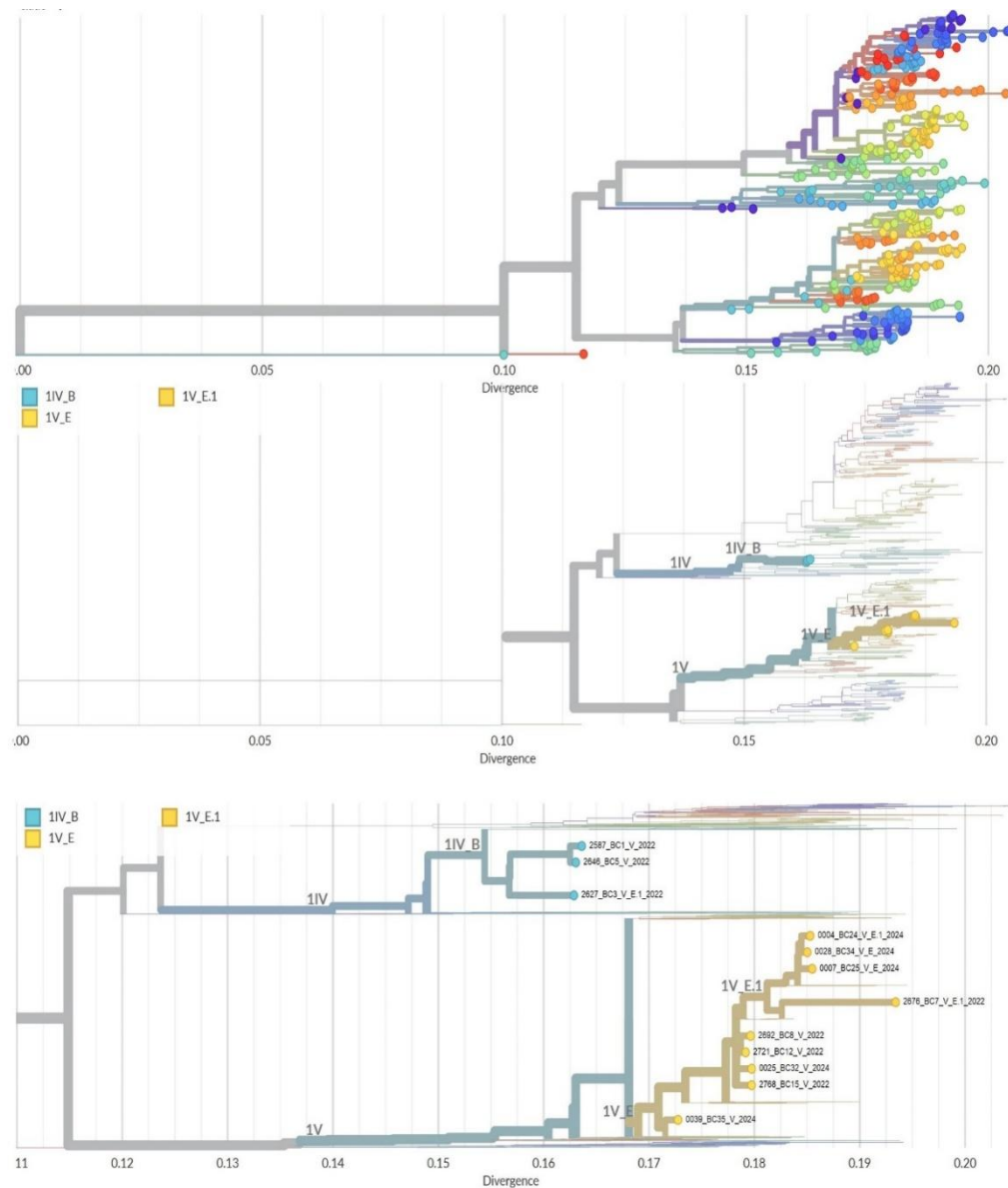


Fig. 1: Phylogenetic positioning of DENV-1 sequences (locus M-E). The reference phylogenetic tree was inferred from 399 global genomes representative of the genetic diversity of DENV-1 (NextClade Dataset for “DENV-1” Based on Reference “Nauru/NMRI-45AZ5PDK-0/1974”), using the IQ-TREE algorithm under the maximum likelihood model and nucleotide substitution selected via ModelFinder for the most appropriate model fit. The DENV-1 sequences under consultation were aligned to the primary reference via multiple alignment and inserted into the reference phylogeny without topology rearrangement. The positioning was determined by identifying the branch that maximizes the similarity of shared mutations, considering only informative sites present in the sequences under consultation. Sites without coverage in the partial sequences were treated as absent, minimally penalizing the calculation of distances and prioritizing shared mutations in informative regions of the M-E locus. Panel A - reference phylogenetic tree, with branches proportional to nucleotide substitutions per site, highlighting the main clades of DENV-1. Panel B - phylogenetic positioning of DENV-1 sequences (M-E locus) colored by assigned genotype. Panel C - clade enlargement illustrating phylogenetic positioning of DENV-1 sequences (M-E locus). Source: Original research data. Own work.

The DENV-1 reference phylogenetic tree, constructed with 399 global genomes, allowed for robust classification of the analyzed sequences in the context of global genetic diversity. All sequences analyzed were assigned to Genotype V, with variations between lineages V_B, V_E, and V_E.1 (Fig. 1), indicating low genetic diversity in the analyzed set. The sequences from the Federal District were consistently grouped into well-defined branches, showing phylogenetic proximity to isolates previously described in Brazil and South America, with no evident temporal segregation between the samples from 2022 and 2024.

Phylogenetic analysis of DENV-2 samples from the 2024 epidemic was performed using the NextClade pipeline. Sequences that met the quality criteria were aligned to the reference genome sequence and inserted into the global phylogeny without altering the tree topology. The phylogenetic positioning of the DENV-2 sequences is shown in Figure 2.

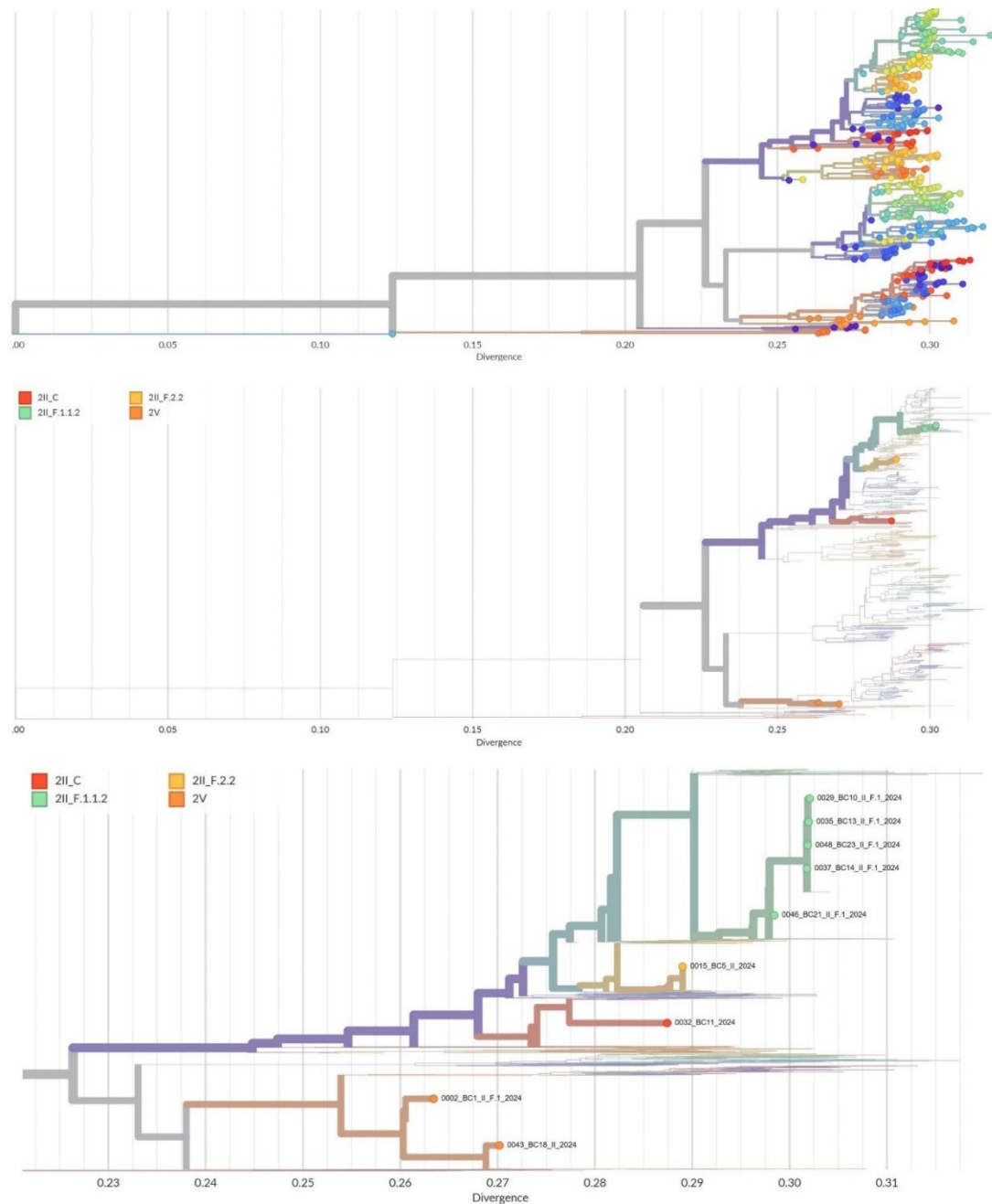


Fig. 2: Phylogenetic positioning of DENV-2 sequences (locus E-NS1-NS2). The reference phylogenetic tree was inferred from 435 global genomes representative of the genetic diversity of DENV-2 (NextClade Dataset for “DENV-2” Based on Reference “Thailand/CDC-16681/1964”), using the IQ-TREE algorithm under the maximum likelihood model and nucleotide substitution selected via ModelFinder for the most appropriate model fit. The DENV-2 sequences under consultation were aligned to the primary reference via multiple alignment and inserted into the reference

phylogeny without topology rearrangement. The positioning was determined by identifying the branch that maximizes the similarity of shared mutations, considering only informative sites present in the sequences under consultation. Sites without coverage in the partial sequences were treated as absent, minimally penalizing the calculation of distances and prioritizing shared mutations in informative regions of the E-NS1-NS2 locus. Panel A - Reference phylogenetic tree, with branches proportional to nucleotide substitutions per site, highlighting the main clades of DENV-2. Panel B - Phylogenetic positioning of DENV-2 sequences (E-NS1-NS2 locus). Colored by assigned genotype. Panel C - Enlargement of clade illustrating phylogenetic positioning of DENV-2 sequences (E-NS1-NS2 locus). Source: Original research data. Own work.

The reference phylogeny of DENV-2, constructed from 435 global genomes, showed the consistent positioning of the analyzed sequences in well-defined branches, without altering the topology of the tree. The sequences from the Federal District were grouped into clades corresponding mainly to Genotype II (Cosmopolitan), with identification of sublineages II_C, II_F.1.1.2, and II_F.2.2, in addition to a few sequences attributed to Genotype V (American). An almost exclusive predominance of Genotype II was observed, with the samples concentrated in a specific grouping of the phylogenetic tree.

Comparatively, phylogenetic profiles show distinct patterns between the two serotypes: while DENV-1 showed greater genetic homogeneity and phylogenetic stability, DENV-2 exhibited greater relative diversity, although concentrated mainly in a single genotype. These findings reinforce differences in the dynamics of viral circulation of serotypes in the epidemiological context evaluated.

Discussion

This study performed molecular characterization of dengue virus (DENV) samples circulating in the Federal District (DF) during the outbreaks of 2022 and 2024, revealing a significant change in the viral circulation profile between the periods. In 2022, DENV-1 was almost entirely predominant (97.6%), with occasional detection of DENV-2, consistent with official epidemiological surveillance data [13]. In contrast, in 2024, a scenario of co-circulation was identified, with a higher proportion of DENV-2 (53.7%) than DENV-1 (40.7%).

The transition from a scenario dominated by a single serotype to co-circulation, with relative predominance of DENV-2, coincided with a significant increase in the number of cases recorded in 2024. Although it is not possible to establish causal relationships, variations in the serotype profile have been described in epidemic contexts and may be associated with changes in population susceptibility [14], [15]. In this context, it is plausible that the population of the Federal District, previously exposed mainly to DENV-1, had lower specific immunity to DENV-2, favoring the expansion of this serotype. The co-circulation of serotypes in hyperendemic settings may also favor immunological phenomena such as antibody-dependent enhancement (ADE), although this study did not evaluate clinical outcomes [16], [17].

Genotyping and phylogeny analyses indicated low genetic diversity among DENV-1 samples, all classified as Genotype V, distributed mainly in the V, V_E, and V_E.1 sublineages. This pattern is consistent with previous studies describing Genotype V as widely established in Brazil since the 1980s and 1990s [18], [19], [20], [21], [22]. The cohesive grouping of sequences, without evident temporal segregation, suggests continuous circulation of genetically related lineages, although the use of partial sequences may underestimate intragenotypic diversity.

In contrast, all DENV-2 samples obtained in 2024 were classified mainly as Genotype II (Cosmopolitan), with a predominance of sublineage II_F.1.1.2. Phylogenetic positioning also revealed the presence of other sublineages of the same genotype and sporadic detection of Genotype V (American), indicating detectable genetic diversity, albeit limited. The high nucleotide similarity with sequences from other Brazilian states is consistent with the recent expansion of the Cosmopolitan genotype in the country, as described in national studies published between 2020 and 2023 [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29].

Differences in sequencing data quality were observed between serotypes, with lower mean Qscore and coverage depth in DENV-1 samples compared to DENV-2. These technical limitations may have impacted phylogenetic resolution, especially for DENV-1, and should be considered in the comparative interpretation of results [30], [31], [32], [33].

In this study, a marked discrepancy was observed between DENV-1 and DENV-2 data, with a mean Qscore of ≈ 7 for DENV-1 and ≈ 14 for DENV-2, in addition to significantly lower depth for DENV-1. Low depth ($<20\times$) associated with a technology with a higher intrinsic error rate can compromise the reliability of consensus sequences and introduce artificial variations, impacting phylogenetic inference [34]. In contrast, DENV-2 samples were of high quality and depth, allowing for a more robust phylogenetic reconstruction that better represented actual evolutionary relationships [35].

From a methodological point of view, the use of the MinION platform demonstrated applicability for decentralized genomic surveillance, in line with initiatives previously described in Brazil [37]. The identification of the Cosmopolitan genotype of DENV-2 in the Federal District reinforces the potential of genomic surveillance as a complementary tool to epidemiological monitoring and public health planning actions, including vector control and vaccination strategies, considering differences in efficacy between serotypes [38].

In summary, the molecular and phylogenetic analysis performed in this study allowed us to characterize the genetic profile of DENV-1 and DENV-2 serotypes circulating in the Federal District during the epidemic periods of 2022 and 2024, revealing a change in the serotype profile between the two intervals, with a higher proportion of DENV-2 in the most recent period. The DENV-1 samples presented a homogeneous genetic profile, with consistent grouping into a single genotype and high similarity between sequences from different periods, indicating low detectable phylogenetic diversity in the analyzed set and compatibility with previously established lineages in Brazil. In contrast, DENV-2 sequences, mostly associated with the 2024 epidemic, were predominantly positioned in Genotype II (Cosmopolitan), with the identification of different sublineages, although concentrated in cohesive phylogenetic clusters, in line with national and international descriptions. Despite technical, sampling, and temporal limitations, the findings contribute to the understanding of the recent dynamics of dengue in the Federal District and reinforce the usefulness of genomic surveillance as a complementary tool for monitoring viral circulation in epidemic contexts. Interpretations of specific

events of introduction, dissemination, or epidemiological impact of the identified genotypes should be made with caution.

Bibliographic References

- [1] M. R. Nunes et al., "Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 4, p. e2769, 2014. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0002769>
- [2] A. S. Cabral et al., "Epidemiological and genetic aspects of the largest dengue outbreak recorded in 2015 in Southeastern Brazil," *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, vol. 63, p. e17, 2021. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163017>
- [3] E. P. Nascimento et al., "The Dengue Epidemic in Brazil: Mini-Review," 2020.
- [4] J. P. Messina et al., "Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history," *Trends in Microbiology*, vol. 22, no. 3, pp. 138-146, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2013.12.011>
- [5] M. G. Teixeira et al., "Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil," *Cadernos De Saude Publica*, vol. 25, suppl. 1, pp. S7-S18, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300002>
- [6] C. R. Vicente et al., "Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil," *BMC Infectious Diseases*, vol. 16, p. 320, 2016. <https://doi.org/10.1186/S12879-016-1668-Y>
- [7] B. A. L. Rocha et al., "Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil," *Infectious Diseases of Poverty*, vol. 6, p. 116, 2017. <https://doi.org/10.1186/S40249-017-0328-9>
- [8] N. R. Faria et al., "Analysis of Clinical and Laboratory Alterations Related to Dengue Case Severity: Comparison between Serotypes 2 and 4 in Brazil," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 97, no. 4, pp. 1086-1093, 2017. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.16-0227>

- [9] M. G. Teixeira et al., "Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil," *Cadernos De Saude Publica*, vol. 25, suppl. 1, pp. S7-S18, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300002>
- [10] P. M. S. Castanha et al., "Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil," *Epidemiology and Infection*, vol. 141, no. 5, pp. 1080-1088, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0950268812001367>
- [11] J. G. Bezerra et al., "Entry of dengue virus serotypes and their geographic distribution in Brazilian federative units: a systematic review," *Revista Brasileira De Epidemiologia*, vol. 24, p. e210020, 2021. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210020>
- [12] L. Sacchetto et al., "Early insights of dengue virus serotype 3 (DENV-3) re-emergence in São Paulo, Brazil," *Journal of Clinical Virology*, vol. 183, p. 105763, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2025.105763>
- [13] Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica 52 de 2023 no Distrito Federal Apresentação. <https://www.saude.df.gov.br/informes-dengue-chikungunya-zika-febre-amarela>
- [14] Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015 Jan;385(9966):453–65. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
- [15] Fares RC, Souza KP, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:321873. doi: 10.1155/2015/321873.
- [16] Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017. doi: 10.1126/science.aan6836. [Internet]. Available from: <https://www.science.org>.
- [17] Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. Vol. 30, *Vaccine*. 2012. p. 4301–6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.114.

- [18] Giovanetti M, Pereira LA, Santiago GA, Fonseca V, Paqueta M, Mendoza G, et al. Emergence of Dengue Virus Serotype 2 Cosmopolitan Genotype, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2022 Aug 1;28(8):1725–7.
- [19] de Jesus JG, Dutra KR, Sales FC da S, Claro IM, Terzian AC, Candido D da S, et al. Genomic detection of a virus lineage replacement event of dengue virus serotype 2 in Brazil, 2019. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115.
- [20] Carneiro AR, Cruz ACR, Vallinoto M, Melo D de V, Ramos RTJ, Medeiros DBA, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 Sep;107(6):805–12. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000600016&lng=en&tlng=en
- [21] Souza UJB de, Macedo Y da SM, Santos RN dos, Cardoso FDP, Galvão JD, Gabev EE, et al. Circulation of Dengue Virus Serotype 1 Genotype V and Dengue Virus Serotype 2 Genotype III in Tocantins State, Northern Brazil, 2021–2022. *Viruses*. 2023 Nov 1;15(11).
- [22] Dos C, Souza S, Santos Caleiro G, Claro IM, Goes De Jesus J, Coletti TM, et al. Phylogenetics, Epidemiology and Temporal Patterns of Dengue Virus type 1 in Araraquara, São Paulo State. Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.09.18.558374>
- [23] Amorim MT, Hernández LHA, Naveca FG, Essashika Prazeres IT, Wanzeller ALM, Silva EVP da, et al. Emergence of a New Strain of DENV-2 in South America: Introduction of the Cosmopolitan Genotype through the Brazilian-Peruvian Border. *Trop Med Infect Dis*. 2023 Jun 1;8(6).
- [24] Poltep K, Phadungsombat J, Nakayama EE, Kosoltanapiwat N, Hanboonkunupakarn B, Wiriyarat W, et al. Genetic Diversity of Dengue Virus in Clinical Specimens from Bangkok, Thailand, during 2018–2020: Co-Circulation of All Four Serotypes with Multiple Genotypes and/or Clades. *Trop Med Infect Dis*. 2021 Sep 4;6(3):162.

- [25] Phadungsombat J, Lin MYC, Srimark N, Yamanaka A, Nakayama EE, Moolasart V, et al. Emergence of genotype Cosmopolitan of dengue virus type 2 and genotype III of dengue virus type 3 in Thailand. *PLoS One*. 2018 Nov 12;13(11):e0207220.
- [26] Selhorst P, Lequime S, Dudas G, Proesmans S, Lutumba P, Katshongo F, et al. Phylogeographic analysis of dengue virus serotype 1 and cosmopolitan serotype 2 in Africa. *International Journal of Infectious Diseases*. 2023 Aug 1;133:46–52.
- [27] Fritsch H, Moreno K, Lima IAB, Santos CS, Costa BGG, de Almeida BL, et al. Phylogenetic Reconstructions Reveal the Circulation of a Novel Dengue Virus-1V Clade and the Persistence of a Dengue Virus-2 III Genotype in Northeast Brazil. *Viruses*. 2023 May 1;15(5).
- [28] Ribeiro JR, Roca TP, Cartonilho G dos S, Passos-Silva AM, Moreira HM, Teixeira KS, et al. DENV-2 Outbreak Associated With Cosmopolitan Genotype Emergence in Western Brazilian Amazon. *Bioinform Biol Insights*. 2024 Jan 1;18.
- [29] Multiple introductions and country-wide spread of DENV-2 genotype II (Cosmopolitan) in Brazil.
- [30] Nguyen HS. Real-time analysis for Nanopore sequencing data. The University of Queensland; 2019.
- [31] Dippenaar A, Costa Conceição E, Wells F, Loubser J, Mann B, De Diego Fuertes M, et al. Exploring the potential of Oxford Nanopore Technologies sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* sequencing: An assessment of R10 flowcells and V14 chemistry. *PLoS One*. 2024 Jun 6;19(6):e0303938.
- [32] Coope RJN, Matic N, Pandoh PK, Corbett RD, Smailus DE, Pleasance S, et al. Automated Library Construction and Analysis for High-Throughput Nanopore Sequencing of SARS-CoV-2. *J Appl Lab Med*. 2022 Sep 1;7(5):1025–36.

- [33] John A, Dreifuss D, Kang S, Bratus-Neuenschwander A, Zajac N, Topolsky I, et al. Assessing different next-generation sequencing technologies for wastewater-based epidemiology. 2024.
- [34] Rang FJ, Kloosterman WP, de Ridder J. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol.* 2018 Dec 13;19(1):90.
- [35] Kafetzopoulou LE, Efthymiadis K, Lewandowski K, Crook A, Carter D, Osborne J, et al. Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples. *Eurosurveillance.* 2018 Dec 13;23(50).
- [36] Vogels CBF, Hill V, Breban MI, Chaguza C, Paul LM, Sodeinde A, et al. DengueSeq: a pan-serotype whole genome amplicon sequencing protocol for dengue virus. *BMC Genomics.* 2024 May 1;25(1):433.
- [37] Naveca FG, Claro I, Giovanetti M, de Jesus JG, Xavier J, Iani FC de M, et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Mar 7;13(3):e0007065.
- [38] Biswal S, Reynales H, Saez-Llorens X, Lopez P, Borja-Tabora C, Kosalaraksa P, et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. *New England Journal of Medicine.* 2019 Nov 21;381(21):2009–19. doi:10.1056/NEJMoa1903869