

Investigação sobre o surto de dengue no segundo semestre de 2022 nos municípios da região do Alto Solimões, região da tríplice-fronteira Brasil, Colômbia e Peru - Relatório preliminar.

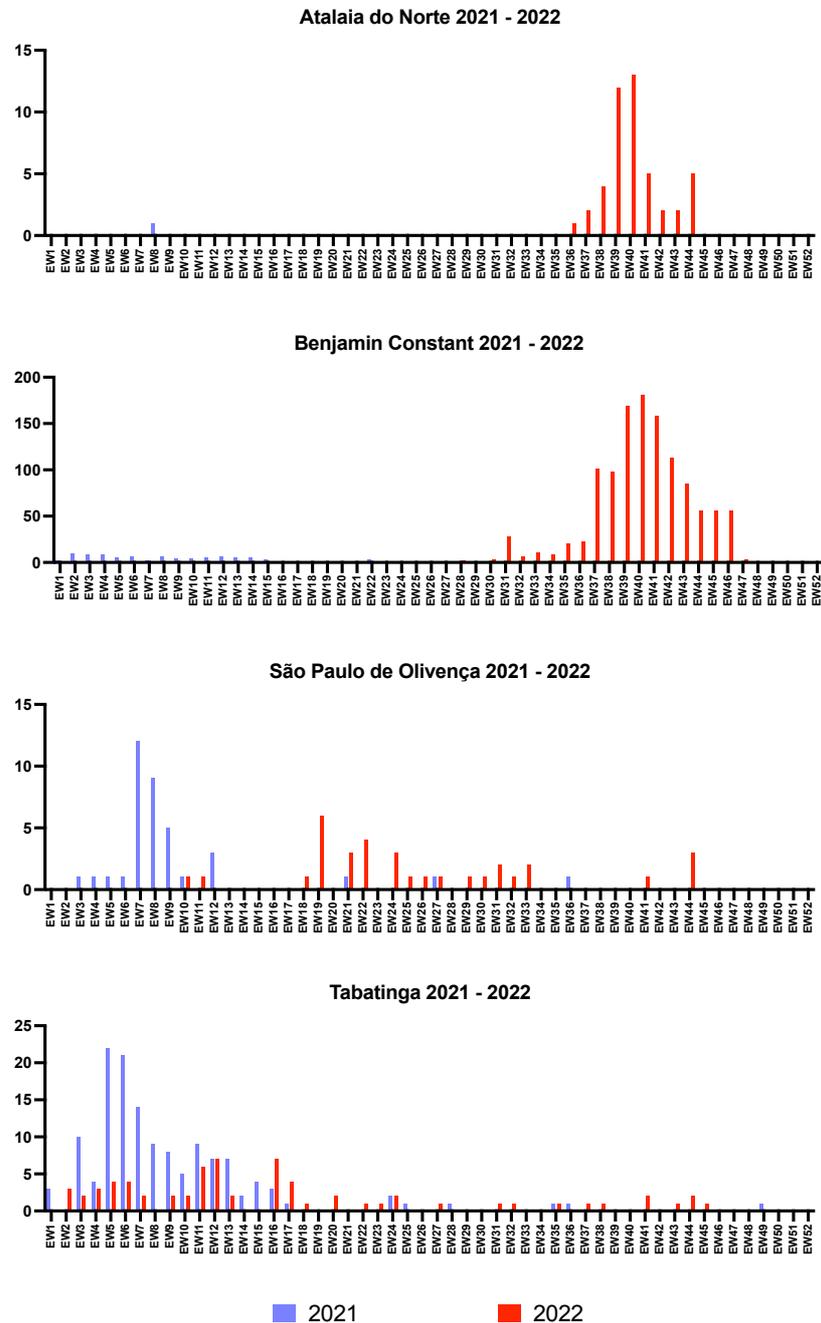
1. Preâmbulo.

No final do mês de novembro de 2022, a Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas – Dra. Rosemary Costa Pinto (FVS-RCP) solicitou ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-Fiocruz Amazônia) – dentro do acordo de colaboração técnico-científica entre as instituições – a caracterização genética de amostras positivas para o vírus dengue, oriundas do Laboratório de Fronteira do Amazonas (LAFRON-AM) que identificou um surto de dengue na região do Alto Solimões. Os casos estão concentrados, principalmente, nos municípios mais próximos à tríplice fronteira internacional Brasil-Colômbia-Peru. Assim, foram enviadas ao ILMD 15 (quinze) amostras positivas para dengue, provenientes dos municípios de Atalaia do Norte, Benjamin Constant, São Paulo de Olivença e Tabatinga.

2. Distribuição de casos de dengue ao longo dos anos de 2021 e 2022 nos municípios de Atalaia do Norte, Benjamin Constant, São Paulo de Olivença e Tabatinga - região do Alto Solimões, Amazonas, Brasil.

Conforme dados obtidos pelas equipes do LAFRON-AM/LACEN-AM/FVS-RCP, houve aumento de casos de dengue confirmados laboratorialmente em 2022 na região do Alto Solimões, estado do Amazonas, Brasil. Esse aumento de casos se deu especialmente a partir da SE 31 nos municípios de Atalaia do Norte e Benjamin Constant, conforme pode ser observado na Figura 1. Por este motivo, foi iniciada uma investigação genômica dos casos em questão pela equipe do ILMD-Fiocruz Amazônia.

Figura 1. Casos de dengue confirmados por semana epidemiológica (EW), nos quatro municípios investigados no estado do Amazonas, 2021 e 2022 (Fonte: LAFRON-AM/LACEN-AM/FVS-RCP).



Casos de dengue nos municípios investigados confirmados laboratorialmente pelo LAFRON-AM ou LACEN-AM usando os métodos: 1) detecção de antígeno NS1, 2) detecção de anticorpos IgM ou 3) detecção de RNA viral por RT-PCR em tempo real (ZDC). É importante destacar a mudança de cenário epidemiológico, com aumento de casos principalmente nos municípios de Benjamin Constant e Atalaia do Norte no segundo semestre de 2022. Gráficos criados com *Graphpad Prism 9.4.1*.

3. Espécimes biológicos, sequenciamento nucleotídico e obtenção de genomas consensos.

Ao chegar no ILMD, os espécimes biológicos foram processados pela equipe do núcleo de Vigilância de Vírus Emergentes, Reemergentes ou Negligenciados (VIVER) do laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA). As amostras de soro ou plasma foram então submetidas à extração de ácidos nucleicos totais com esferas magnéticas em equipamento semiautomatizado (*Promega Maxwell*), seguido da detecção do RNA viral do dengue por RT-PCR em tempo real, conforme protocolo do CDC/EUA para os quatro sorotipos do vírus dengue^[1]. As amostras foram identificadas como pertencentes ao sorotipo DENV-2.

O material genético viral foi então submetido ao sequenciamento nucleotídico utilizando o painel de vigilância viral da empresa *Illumina (VSP w ILMN RNA Prep w Enrich)* em plataforma *NextSeq 1000* instalada no ILMD, de acordo com as orientações do fabricante. O manual *Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation* (# 1000000124435 v03, abril 2021) descreve as etapas para a preparação de bibliotecas genômicas virais, por meio de um método de captura híbrida das regiões de interesse, com o uso de sondas biotiniladas, enriquecimento e sequenciamento completo do genoma de 66 vírus, permitindo a detecção de mutações e novas linhagens sem vieses.

Os arquivos FastQ obtidos de cada amostra foram submetidos às etapas de checagem de qualidade e remoção de duplicatas, sendo então utilizados para a montagem de genomas consenso no programa *Geneious Prime v2022.2.2*. Os genomas consensos obtidos variaram em tamanho de 10.600 até 10.711nt, ou 98,9 até 99,9% do genoma de referência do DENV-2 (NC_001474), sem sítios ambíguos ou não-identificados (“Ns”).

4. Identificação do genótipo do DENV-2.

Os genomas das amostras do Amazonas foram inicialmente submetidos à identificação do genótipo do vírus dengue usando a ferramenta web [Flavivirus Genotyping Tool Version 0.1](#). Esta análise mostrou que os genomas sequenciados nessa investigação pertencem ao genótipo II, ou Cosmopolita, do DENV-2 (*Bootstrap support: 100.0*). As características sócio-demográficas e laboratoriais dos casos de dengue analisados na investigação estão resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características sócio-demográficas e laboratoriais dos casos de dengue analisados na investigação.

Código de identificação	Idade	Sexo	Data da Coleta	Município da Coleta	Sorotipo	Ct ILMD	Genótipo	Tamanho pb	Accession
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200001	26	Feminino	2022-10-11	Atalaia do Norte	DENV-2	28,5	II - Cosmopolita	10654	OP941832
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200002	29	Feminino	2022-11-03	Atalaia do Norte	DENV-2	19,7	II - Cosmopolita	10706	OP941833
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200003	10	Feminino	2022-11-03	Atalaia do Norte	DENV-2	24,7	II - Cosmopolita	10698	OP941834
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200004	35	Feminino	2022-11-04	Atalaia do Norte	DENV-2	21,6	II - Cosmopolita	10706	OP941835
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200005	10	Feminino	2022-11-01	Atalaia do Norte	DENV-2	26,5	II - Cosmopolita	10676	OP941836
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200006	70	Masculino	2022-11-02	Tabatinga	DENV-2	24,1	II - Cosmopolita	10706	OP941837
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200007	31	Masculino	2022-11-03	Tabatinga	DENV-2	24,6	II - Cosmopolita	10676	OP941838
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200008	47	Masculino	2022-10-18	Benjamin Constant	DENV-2	21,9	II - Cosmopolita	10662	OP941839
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200009	25	Masculino	2022-10-18	Benjamin Constant	DENV-2	24,6	II - Cosmopolita	10698	OP941840
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200010	36	Masculino	2022-10-19	Benjamin Constant	DENV-2	21,0	II - Cosmopolita	10706	OP941841
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200011	35	Masculino	2022-10-24	Benjamin Constant	DENV-2	25,7	II - Cosmopolita	10709	OP941842
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200012	51	Feminino	2022-10-24	Benjamin Constant	DENV-2	20,9	II - Cosmopolita	10711	OP941843
Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200013	49	Feminino	2022-11-06	S. P. de Olivença	DENV-2	30,6	II - Cosmopolita	10600	OP941844

Ct = valor do *cycle threshold* na reação de RT-PCR em tempo real realizada no ILMD-Fiocruz Amazônia. Genotipagem: <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/flavivirus/>

Accession: número de acesso do NCBI GenBank (Foi solicitada a liberação imediata das sequências, tão logo haja a revisão pelo staff do GenBank).

5. Reconstrução filogenética do *dataset* global do DENV-2 Cosmopolita por máxima verossimilhança.

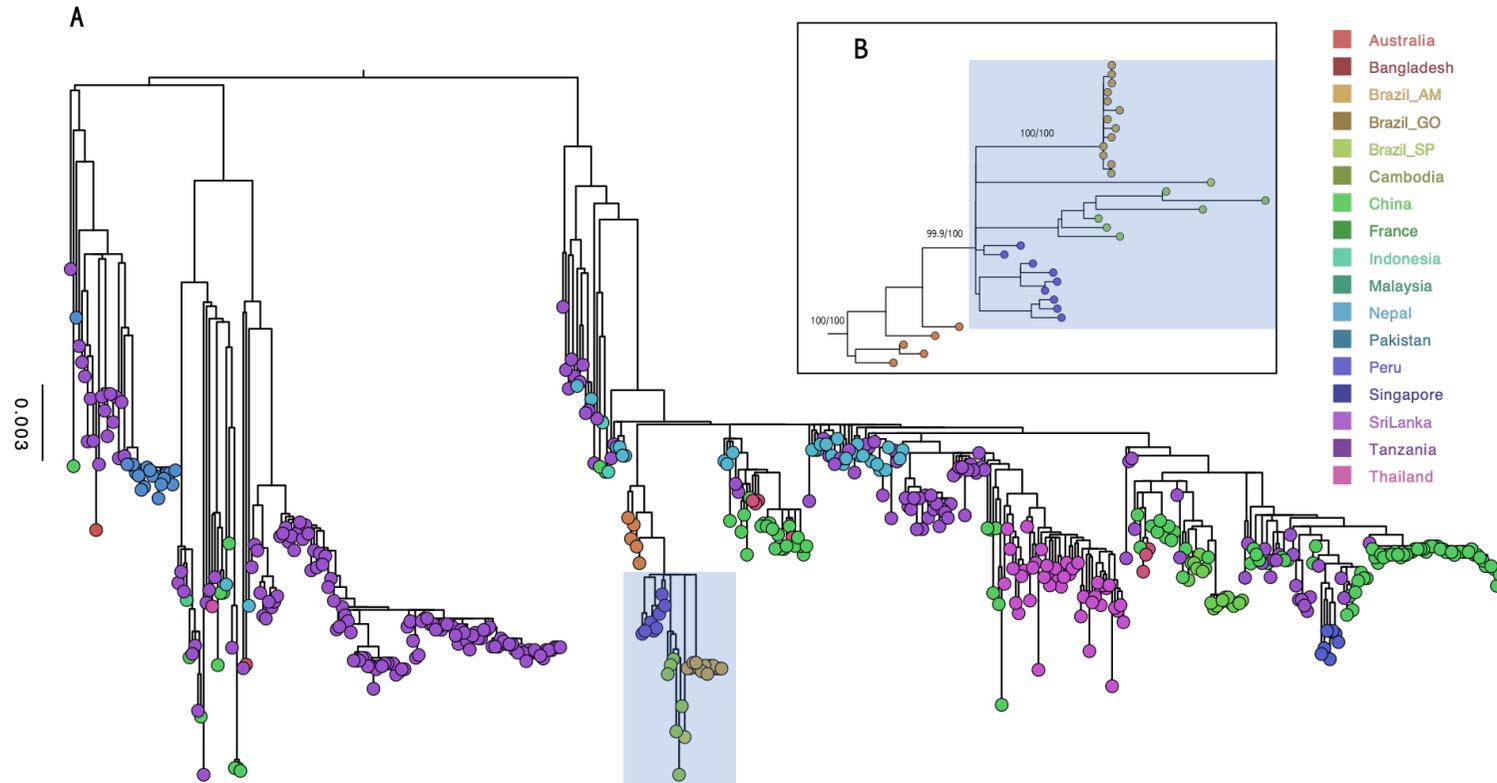
A busca na base de dados do *GenBank* retornou 703 genomas do DENV-2 Cosmopolita com tamanho mínimo de 9.000nt (utilizamos esse ponto de corte para incluir o genoma do primeiro caso de DENV-2 Cosmopolita identificado no Brasil, OM744143, cujo tamanho sequenciado é de 9.289nt). Do total identificado na busca, 525 genomas foram confirmados como pertencentes ao genótipo Cosmopolita, através de análise com a ferramenta [Genome detective Dengue virus tool](#).

Genomas com menor qualidade, isto é, aqueles com >1% de sítios não identificados (“Ns”) ou redundantes (idênticos) foram removidos com auxílio da ferramenta prinseq-lite-0.20.4 [2]. Ao final, 495 genomas do *dataset* global, incluindo sete do Brasil, foram adicionados aos 13 obtidos nessa investigação, sendo alinhados com a ferramenta MAFFT v7.409 [3]. Após a inspeção manual do alinhamento outros dois genomas, oriundos da Malásia, foram removidos do *dataset* por conterem *frameshifts* inesperados. Portanto, o *dataset* final utilizado nesta etapa das análises contém 506 genomas (região codificantes - CDS) do genótipo Cosmopolita do DENV-2.

Esse *dataset* foi então submetido ao programa IQ-TREE2 v2.1.1 [4] para reconstrução filogenética por máxima verossimilhança utilizando modelo TIM2+F+R4, de acordo como o *ModelFinder* [5], sendo os valores de suporte calculados com os testes *Shimodaira–Hasegawa approximate likelihood-ratio test* (SH-aLRT) [6] e *Ultrafast bootstrap* (UFBoot) [7].

Com o resultado dessa análise foi possível observar que os genomas do Amazonas, juntamente com os outros sete genomas do DENV-2 Cosmopolita previamente encontrados no Brasil (Goiás, Aparecida de Goiânia [OM744143] [8] e São Paulo, Piracicaba [ON634742, ON634745, ON634755 e ON634756], São José dos Campos [ON634743] e Santa Rosa do Viterbo [ON634750]), agrupam em um clado monofilético com alto suporte estatístico (SH-aLRT e UFBoot 100/100), **Figura 2 A e B**.

Figura 2. Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança do *dataset* global do genótipo II, Cosmopolita, do DENV-2



A. Árvore filogenética contendo 506 genomas (CDS) do genótipo Cosmopolita do DENV-2 reconstruída pelo método de máxima verossimilhança no programa IQ-TREE2. A árvore foi enraizada no ponto central, com os ramos sendo organizados em ordem crescente. Cada genoma está representado por círculos coloridos de acordo com o país de coleta (ver escalas de cores), com exceção do Brasil, para o qual foi realizada a subdivisão entre as amostras do Amazonas, São Paulo e Goiás. Todas as edições realizadas no programa [FigTree v1.4.4](https://github.com/jcvi/figtree).

B. Imagem ampliada do clado contendo as amostras brasileiras e peruanas. Os valores de suporte dos testes SH-aLRT e UFBoot são mostrados para os principais ramos.

6. Reconstrução espaço-temporal da introdução do DENV-2 Cosmopolita no Amazonas, Brasil

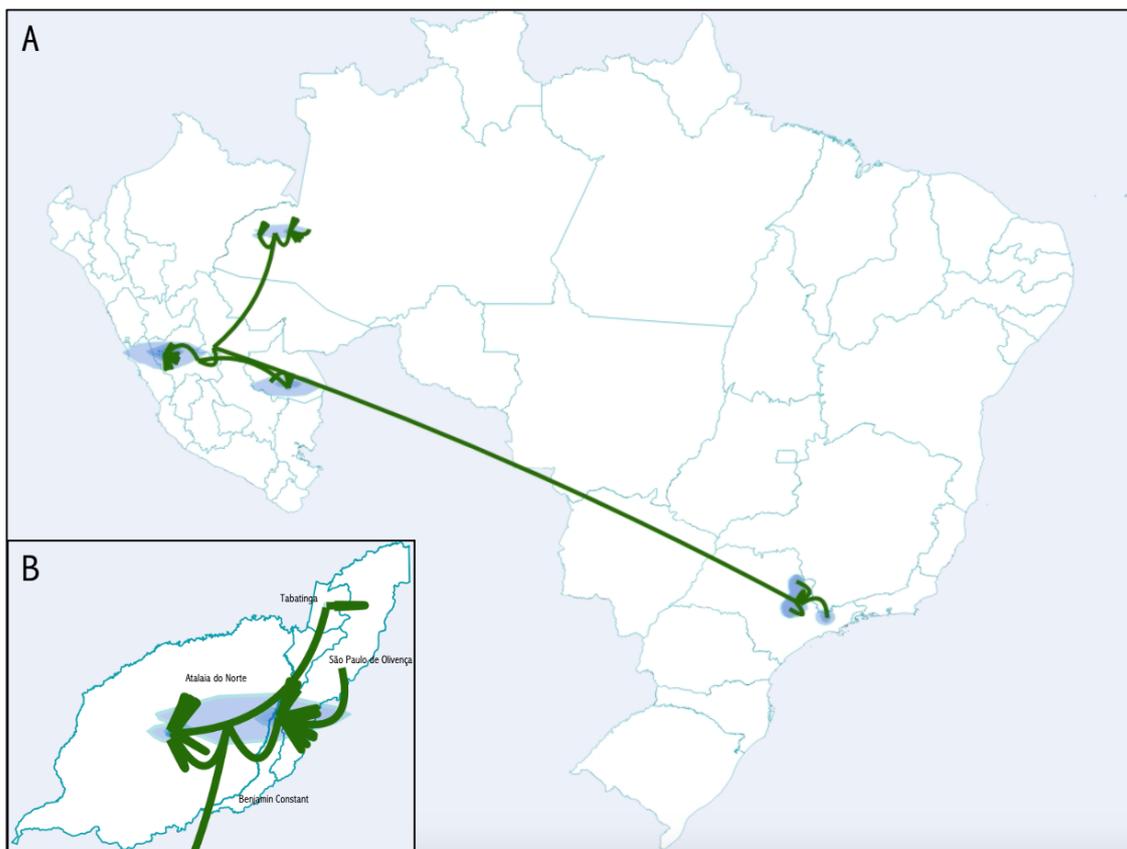
Para estimar quando houve a introdução do DENV-2 Cosmopolita no Amazonas nos investigamos, inicialmente, o sinal temporal do clado de interesse (sombreado em azul na Figura 2A e B) com a ferramenta TempEst v1.5.3 ^[9]. Os resultados mostraram que o clado contém uma razoável estrutura temporal (*correlation coefficient* = 0.59; *R squared* = 0.34), mas que esta é afetada negativamente por quatro genomas que poderiam ser considerados *outliers*. Ao remover esses genomas, encontramos valores de suporte mais altos (*correlation coefficient* = 0.96; *R squared* = 0.92). Sendo assim, as análises subsequentes utilizaram esse *dataset* sem *outliers*.

A reconstrução da dispersão espaço-temporal foi realizada por inferência Bayesiana no programa BEAST v1.10.4 ^[10], utilizando modelo de filogeográfico contínuo (GTR+G4|RRW_Cauchy|UCLD|Skygrid), escolhido após análise de MLE (*marginal likelihood estimation: path sampling (PS) / stepping-stone sampling*). Uma corrida de MCMC foi realizada com 200 milhões de gerações, sendo a convergência confirmada pelos parâmetros de ESS > 200, observados no software *Tracer* v1.7.1 ^[11]. Todas as inferências Bayesianas foram realizadas utilizando a estrutural computacional do portal CIPRES (*Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research*, <https://www.phylo.org>)

Os resultados da análise filogeográfica contínua suportam uma introdução muito recente do DENV-2 Cosmopolita no Amazonas, sendo o mês mais provável agosto de 2022, com intervalo de confiança de junho até outubro de 2022 (tMRCA 2022-08-16 [2022-06-28, 2022-10-03]). A trajetória de disseminação do DENV-2 Cosmopolita até sua chegada no Amazonas pode ser observada na **Figura 3**.

Finalmente, tanto os resultados da análise filogeográfica utilizando o modelo discreto reversível (dados não mostrados), quanto o contínuo, suportam que a introdução do genótipo Cosmopolita no Amazonas é um evento independente da introdução prévia em Goiás ou São Paulo, sendo sua origem mais provável oriunda do Peru.

Figura 3. Introdução e disseminação espaço-temporal do genótipo Cosmopolita do DENV-2 no Amazonas.



A análise mostra a introdução do DENV-2 Cosmopolita no Amazonas (A) com disseminação nos municípios de Atalaia do Norte, Benjamin Constant, São Paulo de Olivença e Tabatinga (frame: final de outubro de 2022), detalhado em B. Também é mostrada a introdução no estado de São Paulo. A introdução no Amazonas, estimada através da análise filogeográfica contínua, ocorre entre o período de junho até outubro de 2022 (tMRCA 2022-08-16 [2022-06-28, 2022-10-03]). A representação da difusão espaço-temporal foi realizada com o programa *Spread4* ^[12] (<https://spreadviz.org/home>), com base na árvore de máxima credibilidade de clados (MCC) da inferência filogeográfica contínua. O arquivo de coordenadas *GeoJSON* foi criado no programa QGIS v3.14 (<https://qgis.org/>) com base nos arquivos de formato *Shapefile* obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (<https://portaldemapas.ibge.gov.br/portal.php#homepage>).

7. Considerações finais

Ao analisarmos os dados epidemiológicos e genéticos disponíveis até o presente momento, foi possível observar que o aumento de casos de dengue ocorrido na região do Alto Rio Solimões, em especial nos municípios de Atalaia do Norte e Benjamin Constant, acontece no segundo semestre de 2022 (**Figura 1**). Esse aumento acontece mais precisamente a partir da semana epidemiológica 31 (31/07/2022 à 06/08/2022), portanto, anterior ao período sazonal de aumento de casos de dengue no Amazonas, o qual normalmente coincide com a temporada de maiores médias pluviométricas – novembro e março (<http://climanalise.cptec.inpe.br/~rcliman1/boletim/cliesp10a/fish.html>).

Pelo descrito anteriormente, o aumento de casos de dengue na região investigada coincide com o período estimado para a introdução do DENV-2 Cosmopolita no Amazonas (tMRCA 2022-08-16 [2022-06-28, 2022-10-03]).

No entanto, outros fatores, tais como climáticos (por exemplo, *La Niña*, que ocorre desde 2020) e o índice de infestação pelo *Aedes aegypti*, aferido normalmente pelo LIRAA, também podem estar relacionados ao aumento de casos de dengue na região. Experimentos adicionais encontram-se em andamento para melhor caracterizar a investigação do surto na região do Alto Solimões.

Manaus-AM, 05 de dezembro de 2022.

Felipe Gomes Naveca
Pesquisador em Saúde Pública
Fiocruz

8. Referências

1. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):4977-83. doi: 10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005.
2. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011 Mar 15;27(6):863-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026.
3. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013 Apr;30(4):772-80. doi: 10.1093/molbev/mst010.
4. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* 2020 May 1;37(5):1530-1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015. Erratum in: *Mol Biol Evol.* 2020 Aug 1;37(8):2461.
5. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods.* 2017 Jun;14(6):587-589. doi: 10.1038/nmeth.4285.
6. Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Mol. Biol. Evol.* 1999 Aug 1;16(8):1114-1116. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026201.
7. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol.* 2018 Feb 1;35(2):518-522. doi: 10.1093/molbev/msx281.
8. Giovanetti M, Pereira LA, Santiago GA, Fonseca V, Mendoza MPG, de Oliveira C, de Moraes L, Xavier J, Tosta S, Fritch H, de Castro Barbosa E, Rodrigues ES, Figueroa-Romero D, Padilla-Rojas C, Cáceres-Rey O, Mendonça AF, de Bruycker Nogueira F, Venancio da Cunha R, de Filippis AMB, Freitas C, Peterka CRL, de Albuquerque CFC, Franco L, Méndez Rico JA, Muñoz-Jordán JL, Lemes da Silva V, Alcantara LCJ. Emergence of Dengue Virus Serotype 2 Cosmopolitan Genotype, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2022 Aug;28(8):1725-1727. doi: 10.3201/eid2808.220550.
9. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2016 Apr 9;2(1):vew007. doi: 10.1093/ve/vew007.
10. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018 Jun 8;4(1):vey016. doi: 10.1093/ve/vey016.
11. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol.* 2018 Sep 1;67(5):901-904. doi: 10.1093/sysbio/syy032.
12. Nahata KD, Bielejec F, Monetta J, Dellicour S, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Lemey P. SPREAD 4: online visualisation of pathogen phylogeographic reconstructions. *Virus Evol.* 2022 Sep 26;8(2):veac088. doi: 10.1093/ve/veac088.