

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

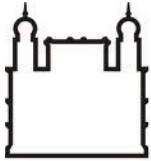
Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas

**ANÁLISES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS DOS
VÍRUS INFLUENZA A(H3N2): PAPEL DO BRASIL NO
CENÁRIO DE DISPERSÃO GLOBAL E AJUSTE TEMPORAL
ENTRE AS CEPAS VACINAIS E OS VÍRUS CIRCULANTES NO
PERÍODO DE 1999 A 2012.**

PRISCILA DA SILVA BORN

Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

PRISCILA DA SILVA BORN

Análises filogenéticas e filogeográficas dos vírus influenza A(H3N2): papel do Brasil no cenário de dispersão global e ajuste temporal entre as cepas vacinais e os vírus circulantes no período de 1999 a 2012.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e de Sistemas.

Orientadores: Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor
Prof. Dr. Fernando do Couto Motta

RIO DE JANEIRO

2013

B736 Born, Priscila da Silva

Análises filogenéticas e filogeográficas dos vírus influenza A(H3N2): papel do Brasil no cenário de dispersão global e ajuste temporal entre as cepas vacinais e os vírus circulantes no período de 1999 a 2012. / Priscila da Silva Born. – Rio de Janeiro, 2013.

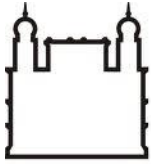
ix, 85 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2013.

Bibliografia: f. 50-57

1. Influenza A (H3N2). 2. Hemaglutinina. 3. Análise filogenética. 4. Filogeografia. 5. Dinâmica evolutiva. I. Título.

CDD 614.518



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

PRISCILA DA SILVA BORN

Análises filogenéticas e filogeográficas dos vírus influenza A(H3N2): papel do Brasil no cenário de dispersão global e ajuste temporal entre as cepas vacinais e os vírus circulantes no período de 1999 a 2012.

Orientadores: Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor
Prof. Dr. Fernando do Couto Motta

Aprovada em: 26/09/2013

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira - Presidente
Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Paulo Vicente
Prof. Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago
Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão
Prof. Dr. Marcos Paulo Catanho de Souza

Rio de Janeiro, 26 de Setembro de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, Cesar e Nilce, exemplos de perseverança, que me ensinaram a lutar por meus sonhos. A finalização desse estudo representa a conquista de mais uma grande etapa da minha vida onde vocês foram essenciais. Obrigada!
Amo vocês.

Dedico a minha irmã e melhor amiga, Vanessa, quem me faz enxergar, que felicidade é uma questão de escolha. Obrigada por me perturbar sempre, não teria sido tão bom e agradável escrever este trabalho se eu estivesse longe de você, eu te amo irmã.

Dedico ao meu amor, Fernando, fundamental para o desenvolvimento e finalização deste estudo através do seu amor, compreensão e paciência; por não me deixar esquecer que 'não devemos andar ansiosos por coisa alguma, mas em tudo, pela oração e súplicas, e com ação de graças, apresentar nossos pedidos a Deus' (Fp 4:6). Dedico também a Ana Clara, minha jóia preciosa que alegra minha vida com suas descobertas sobre o mundo, no auge dos seus seis aninhos. Te amo minha pequenininha!

Dedico ao meu tio e padrinho, Ronaldo Mello (in memorian), e ao meu cunhado, Fabrício Palhinha (in memorian), por todos os momentos de felicidade que me proporcionaram, no decorrer da vida, cujas ausências tornaram este trabalho mais árduo e meus dias menos alegres.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Gonzalo Bello, por aceitar orientar meu trabalho de dissertação, além de ensinar-me todas as análises filogenéticas, evolutivas e de filogeografia em tão pouco tempo; por confiar na minha capacidade, pela amizade e, sobretudo, pela paciência que teve comigo ao longo do mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr. Fernando Motta, por ter me ensinado toda a parte de biologia molecular, por ter acreditado na importância deste trabalho e pela amizade e profissionalismo dedicados, ao longo desses anos de trabalho juntos.

Ao Dr. Eduardo Volotão, pela disponibilidade, atenção dispensada e dedicação pelo trabalho árduo de revisão deste trabalho.

À Dra. Marilda Siqueira, por tornar possível trabalhar ao seu lado, por brindar-me com a oportunidade de realizar os meus estudos de pós-graduação no Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo e por todo apoio recebido ao longo deste processo de formação acadêmica.

A todos os colegas do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz, pelo convívio diário, apoio e grande amizade, especialmente à Paola, Daniela e Sharon, por todas as discussões enriquecedoras no desenvolvimento deste trabalho e por toda fraternidade.

Aos colegas do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, em especial ao Edson Delatorre, pela ajuda com algumas figuras, artigos e risadas.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas, e a todo o corpo docente, pela formação acadêmica recebida e pelas orientações oportunas em muitas disciplinas.

A todos meus colegas da Pós-Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas, em especial aos amigos Alberto, André, Eudislane (Di), Leandro, Paulo, Tavares e Vivian, pelos momentos incríveis passados juntos, fazendo alguma disciplina, ou nos momentos em que tomávamos café, os quais renderam bons papos.

Aos meus amigos queridos, novos e da vida inteira, pelos momentos em que não permitiram que eu desanimasse, fazendo-me rir muito, ouvindo meu choro, dando-me colo e perdoando minhas ausências... Marcos Lima, Danielle Lima, Karen Gomes, Suellem Henriques, Michele Born, Fabiana Born, Rebeca (Reb) e Marcela (Má), vocês são os meus presentes mais raros. Em especial agradeço aos amigos da Igreja Batista da Orla de Niterói e à Juventude Sal da Primeira Igreja Batista de Cosmos que sustentam-me em oração, e por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo e com minha família. Aos amigos Davi Duarte, Franklin, Larissa (Lalá) e Suelen Magalhães, que estiveram sempre disponíveis a me ajudar no que eu precisasse para concluir este trabalho.

À minha família do coração, Alberto (Alb), Calebe e Alê Motta, por todo carinho e apoio, em especial ao querido Marecil Motta que sempre me recebeu de braços abertos, ajudando-me muito na concretização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida durante os dois anos do curso.

E, finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pós-graduação.

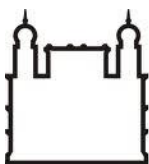
"The God of the Bible is also the God of the genome. He can be worshiped in the cathedral or the laboratory."

"O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Ele pode ser adorado na catedral ou no laboratório."

Francis S. Collins

"Existem coisas melhores adiante do que qualquer outra que deixamos para trás. Mera mudança não é crescimento. Crescimento é a síntese de mudança e continuidade, e onde não há continuidade não há crescimento."

C. S. Lewis



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

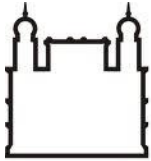
Análises filogenéticas e filogeográficas dos vírus influenza A(H3N2): papel do Brasil no cenário de dispersão global e ajuste temporal entre as cepas vacinais e os vírus circulantes no período de 1999 a 2012.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscila da Silva Born

Os vírus influenza são a causa mais frequente de doença respiratória aguda com necessidade de intervenção médica afetando indivíduos de todas as faixas etárias. O subtipo A(H3N2) tem sido dominante em epidemias sazonais de influenza desde 1968. Estudos anteriores sugerem que a dinâmica evolutiva do influenza A(H3N2) é modelada pela interação complexa entre elevadas taxas de mutação viral, os rearranjos gênicos, a seleção exercida pelo sistema imune, e o fluxo de migração populacional dentro e entre distintas regiões do mundo. No Brasil, o conhecimento da epidemiologia e evolução dos vírus influenza ainda é incipiente. Nosso objetivo, portanto, foi estudar a evolução do vírus influenza A(H3N2) no Brasil a fim de verificar o papel do País no cenário global de dispersão do vírus, reconstruir o perfil de migração viral nas diferentes regiões e verificar a compatibilidade da vacina com as cepas virais circulantes no período compreendido neste estudo. Para isso, fizemos análises de distâncias genéticas assim como análises evolutivas e filogeográficas da porção HA1 do gene hemaglutinina (HA) de amostras de influenza A(H3N2) coletadas nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste do Brasil entre 1999-2012, comparando-as com sequências de cepas vacinais e de sequências de outras regiões geográficas representativas de cada continente, para o mesmo período. Observamos que a composição da vacina não foi a mais adequada para sete dos 14 anos avaliados e que poucas mutações em resíduos de aminoácidos localizados nos sítios antigênicos da HA podem dar origem a novas cepas antigenicamente distintas num relativo curto período de tempo. A taxa média de evolução da porção HA1 do gene HA influenza A(H3N2) foi estimada em $5,1 \times 10^{-3}$ subst./sítio/ano. As análises filogenéticas e filogeográficas das sequências de influenza A(H3N2) indicaram uma forte estrutura temporal e uma menor, porém significativa, estrutura geográfica. Verificamos que o Brasil desempenha um papel marginal na emergência e disseminação de novas variantes no nível global. As principais fontes de disseminação do vírus influenza A(H3N2) para o Brasil são outros países das Américas sendo que a principal porta de entrada no País é a região Sudeste. Dentro do Brasil, o maior fluxo parece acontecer entre as regiões Sudeste e Sul, e em menor escala, entre as Regiões Sul e Nordeste.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Phylogenetic and phylogeographic analyzes of influenza A(H3N2): the role of Brazil in the global dispersion and temporal adjustment between vaccine strains and circulating viruses in the period 1999-2012.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscila da Silva Born

The influenza virus is the most frequent cause of acute respiratory illness requiring medical intervention, affecting individuals from all age groups. The viral subtype A(H3N2) has been dominant in most seasonal influenza epidemics since 1968. Previous research suggests that the evolutionary dynamics of influenza A(H3N2) is characterised by a complex interaction between the high viral mutation rate, gene rearrangements, selection exerted by the immune system and the migration flow of populations within and between different regions of the world. In Brazil, knowledge of influenza virus epidemiology and evolution is still incipient. Thus, our objective was to investigate the evolution of influenza A(H3N2) in Brazil in order to verify the role of the country in the global spread of the virus, to reconstruct the profile of viral migration in different regions of Brazil and check the compatibility between the vaccine and the virus strains circulating in the country during the period of this study. Sequences of the HA1 portion of the hemagglutinin (HA) gene from strains collected in the Northeast, Southeast and South of Brazil between 1999 to 2012, were compared with sequences of vaccine strains and sequences from other geographical regions and subjected to genetic distance, evolutionary and phylogeographic analyses. Our analysis showed that the vaccine composition was not the most suitable for seven of the 14 years evaluated and that a few mutations in amino acid residues located in the antigenic sites of HA are able to give rise to new variants in a relatively short period of time. The evolution rate of the HA1 portion of the HA gene of influenza A(H3N2) was estimated at 5.1×10^{-3} subst./site/year. The phylogenetic and phylogeographic analysis of influenza A(H3N2) showed a strong temporal structure and a minor, however significant geographical structure. The reconstruction of the worldwide dissemination dynamic of influenza A(H3N2) allows us to verify that Brazil has a marginal role in the emergence and dissemination of new viral variants at a global scale. Brazil was tightly connected to other American countries and the major entrance of influenza A(H3N2) in Brazil seems to be by the Southeast region. Within Brazil, the major flux of transmission appears to be from the Southeast to the South and to a less extent from the South to the Northeast.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Propriedades gerais dos vírus influenza	1
1.1.1. Classificação	1
1.1.2. Estrutura genômica do vírus influenza A	2
1.1.3. Hemaglutinina dos vírus influenza A	3
1.1.4. Mecanismos de variabilidade genética dos vírus influenza A	5
1.1.5. Replicação viral	6
1.1.6. Epidemiologia da infecção pelos vírus influenza	7
1.1.7. Pandemias ocasionadas pelos vírus influenza A	9
1.1.8. Tratamento, prevenção e controle	10
1.2. Influenza A(H3N2)	13
1.2.1. Evolução molecular do vírus influenza A (H3N2)	13
1.2.2. Dinâmica espaço-temporal dos vírus influenza A(H3N2)	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Sequências de vírus influenza A(H3N2) brasileiras	19
3.2. Sequências de referência de vírus influenza A(H3N2)	20
3.3. Extração do RNA	21
3.4. Amplificação e sequenciamento dos fragmentos gênicos da HA	21
3.5. Alinhamento e análise filogenética dos fragmentos da porção HA	23
3.6. Análise de distância genética e antigenicidade	24
3.7. Análises da estrutura temporal e geográfica das árvores filogenéticas	25
3.8. Análises evolutivas e filogeográficas	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Identificação de linhagens antigênicas na população Brasileira	26
4.2. Ajuste das cepas vacinais para as variantes virais que circulam no Brasil	29
4.3. Ajuste das cepas vacinais para o Hemisfério Sul	31

4.4. Seleção das sequências de referência	32
4.5. Análises da estrutura temporal e geográfica das árvores filogenéticas	32
4.6. Análises evolutivas e filogeográficas	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERÊNCIAS	50
9. APÊNDICES	58
9.1. APÊNDICE A - Lista om os números de acesso das sequências do Brasil	58
9.2. APÊNDICE B - Lista com os números de acesso das sequências de outros países	61
9.3. APÊNDICE C - Dados de distância genética para nucleotídeos	64
9.4. APÊNDICE D - Dados de número de diferenças de aminoácidos	73
9.5. APÊNDICE E - Dados de número de diferenças entre os grupos	82
9.6. APÊNDICE F - Número de amostras positivas por subtipo de influenza durante o período de 1999 a 2012 no Brasil	83

1. INTRODUÇÃO

Os vírus influenza são os principais agentes de infecção respiratória aguda na população humana, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade, constituindo uma carga importante sobre os serviços de saúde. Em todo o mundo, estima-se que as epidemias anuais de influenza resultem em cerca de três a cinco milhões de casos graves da doença, dos quais cerca de 250.000 a 500.000 evoluem para o óbito. Nos países industrializados, a maioria das mortes associadas ao vírus ocorre em pessoas com 65 anos ou mais, ou em crianças abaixo de dois anos (WHO, 2009).

Há três tipos de vírus influenza que circulam na população humana, denominados A, B e C. O vírus influenza tipo A distingue-se por apresentar a maior diversidade genética, infectar o maior número de espécies hospedeiras e ocasionar a maioria das doenças graves em seres humanos, incluindo as grandes pandemias (Nelson & Holmes, 2007). Esses vírus são encontrados numa ampla gama de hospedeiros, sendo as aves aquáticas migratórias os reservatórios primários dos vírus influenza na natureza (Webster & Bean-Jr, 1998).

1.1. Propriedades gerais dos vírus influenza

1.1.1. Classificação

Os vírus influenza pertencem à família Orthomyxoviridae, e aos três gêneros, Influenzavirus A, B e C, possuem genoma composto por ácido ribonucleico (RNA) segmentado, de fita simples e polaridade negativa (Fauquet & Fargette, 2005). Esses vírus causam epidemias sazonais regularmente em humanos, além de outras espécies de mamíferos e aves. O primeiro vírus influenza humano, denominado então de vírus influenza A, foi descrito em laboratório por Wilson Smith e sua equipe em 1933. Em 1940, um vírus distinto antigenicamente foi isolado e denominado vírus influenza tipo B, e o primeiro vírus influenza C foi descrito em 1947 (Wright et al., 2007). A partícula viral pode ser dividida em três grandes porções: o envelope, formado por uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro, na qual estão inseridas as glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e o canal iônico (M2); o capsídeo viral, formado pela proteína da matriz (M1), posicionada internamente ao envelope, envolvendo o core viral, constituído pelas ribonucleoproteínas (RNPs), como são chamadas as estruturas compostas pelo RNA viral, nucleoproteína (NP) e o complexo polimerase (PA, PB1 e PB2), (Ruigrok, 1998, Skehel, 2009). Os genomas dos vírus influenza A e B possuem oito segmentos e o do vírus influenza C, sete (Palese & Shaw, 2007) (Figura 1.1).

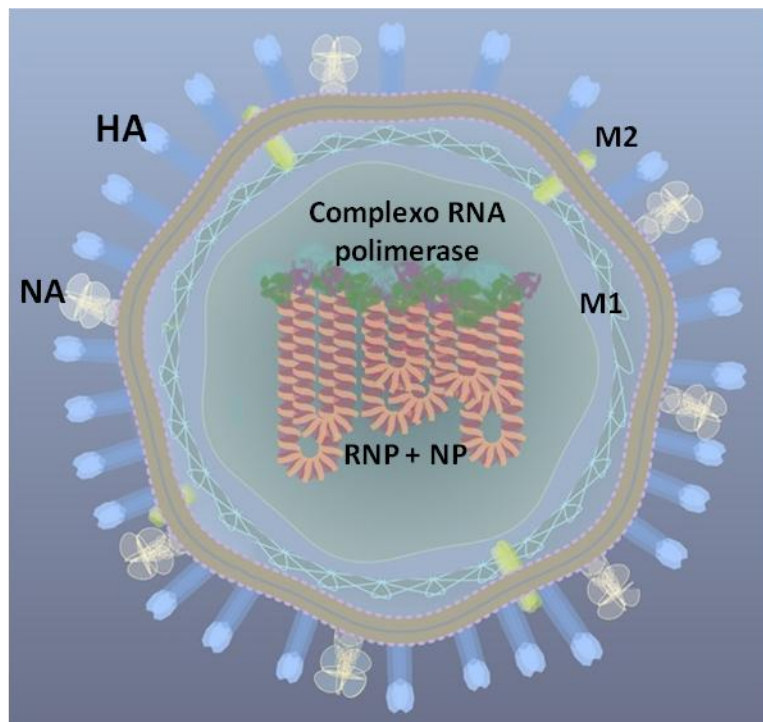


Figura 1.1: Representação esquemática da partícula viral do influenza. Adaptado de (McHardy & Adams, 2009).

O gênero influenza A é dividido em subtipos de acordo com a combinação de HA e NA. Esses dois antígenos de superfície compõem a vacina particulada anti-influenza, reformulada anualmente com base na circulação dos vírus influenza, no ano anterior, nos Hemisférios Norte e Sul (Cox & Subbarao, 1999, Mello et al., 2009). Atualmente, já foram descritos 17 tipos de HA (H1 a H17) e nove tipos de NA (N1 a N9) (Palese & Shaw, 2007, Tong et al., 2012). Para a nomenclatura do vírus influenza A, além do seu gênero viral, é importante designar seu subtipo entre parênteses, o hospedeiro, caso não seja o homem, o país ou cidade de origem, o número da amostra no laboratório e o ano. Por exemplo, A/swine/Iowa/15/30 (H1N1), descreve um vírus influenza A isolado a partir de um suíno em Iowa, em 1930, o número da amostra é 15 e trata-se do subtipo H1N1 (Wright et al., 2007).

1.1.2. Estrutura genômica do vírus influenza A

Os vírus influenza A possuem oito segmentos de RNA que codificam para uma ou mais proteínas cada um. As características desses segmentos gênicos, das proteínas codificadas e suas respectivas funções estão representadas na Figura 1.2. Esses segmentos contêm regiões não-codificantes em ambas extremidades (5' e 3'), conservadas entre os segmentos, seguidas por uma região não-codificante específica do segmento, anterior a região codificante propriamente dita.

As regiões codificantes dos segmentos PB1, M1 e NS1 possuem mais de uma fase de leitura aberta (ORF - do inglês, "Open Reading Frame") como por exemplo, o segmento PB1, que codifica para o peptídeo integral do mesmo nome com ORF 0, e para a proteína acessória PB1-F2 em ORF+1. Os segmentos gênicos, M e NS, dão origem, por "splicing", aos RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam para as proteínas M2 e NEP/NS2, respectivamente. O códon de iniciação (AUG) destes genes está em uma sequência de 56 nucleotídeos localizada antes do íntron (Palese & Shaw, 2007).

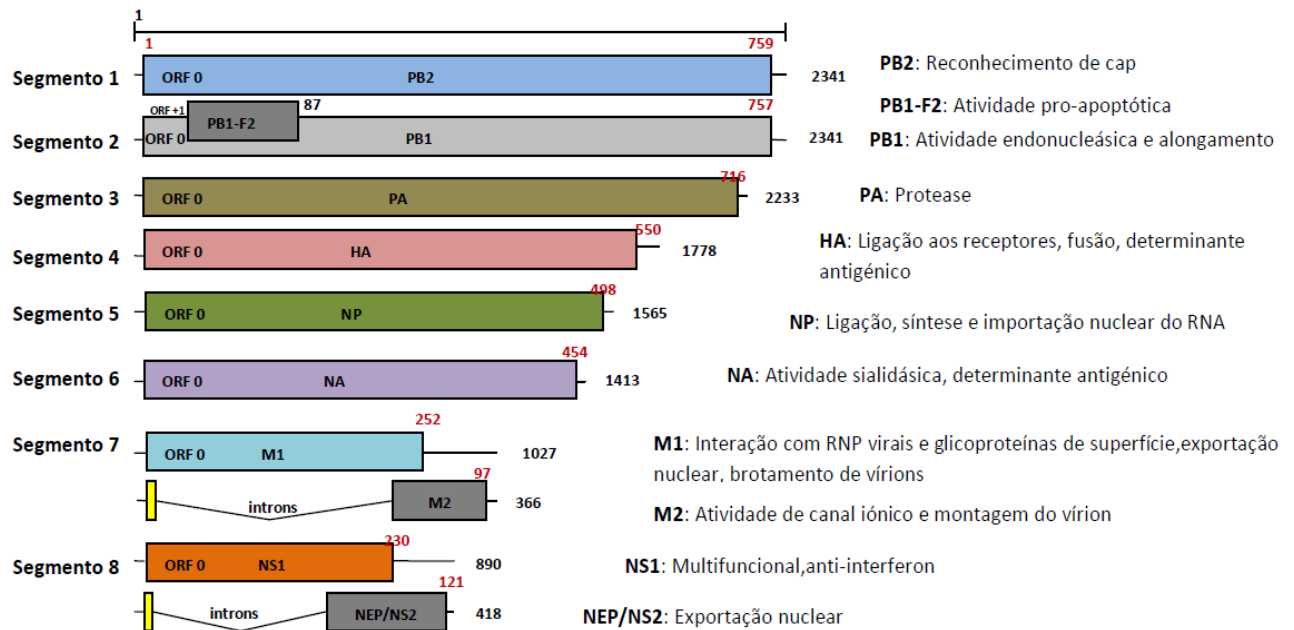


Figura 1.2: Segmentos gênicos do influenza A (total de nucleotídeos em preto) mostrados no sentido positivo, suas respectivas proteínas codificadas (número de aminoácidos em vermelho) e suas principais funções (à direita). As linhas nos extremos 5' e 3' indicam regiões não-codificantes. Adaptado de (Palese & Shaw, 2007).

1.1.3. Hemaglutinina dos vírus influenza A

Os processos de ligação aos receptores de superfície da célula hospedeira e de fusão entre a membrana da partícula viral e a membrana endossômica são realizados pela glicoproteína de superfície HA. A glicoproteína HA é inicialmente sintetizada como uma cadeia polipeptídica simples (HA0, 550 aminoácidos) no RER e, posteriormente, seu processamento envolve a glicosilação e a clivagem pós-traducional por proteases celulares, em duas subunidades monoméricas originando as subunidades HA1 (328 aa) e HA2 (222 aa), que permanecem associadas por ligação dissulfeto e apresentam funções específicas (Figura 1.3). O domínio N-terminal hidrofóbico da subunidade HA2 medeia a fusão entre a partícula viral e a membrana endossômica. Já o domínio HA1 engloba o sítio de ligação ao receptor que irá garantir a

especificidade de ligação de ácido siálico com a galactose alfa2-3 ou alfa2-6 e conseqüentemente a gama de hospedeiro do vírus (Steinhauer & Wharton, 1998). A HA é a porção mais antigênica da partícula viral, sendo a estrutura para qual os anticorpos neutralizantes são dirigidos (Yewdell et al., 1986) e, portanto, o principal componente viral para o desenvolvimento da vacina anti-influenza (Steinhauer & Wharton, 1998). A HA possui cinco sítios antigênicos que podem sofrer mutações capazes de gerar tanto variantes quanto à especificidade de reconhecimento ao receptor celular, quanto de escape aos anticorpos neutralizantes (Muñoz & Deem, 2005) (Figura 1.4). A pressão do sistema imune conduz a elevadas taxas de mutação nos sítios antigênicos da HA (Deem & Pan, 2009), o que explica a grande variabilidade desta proteína (Wiley & Skehel, 1987).

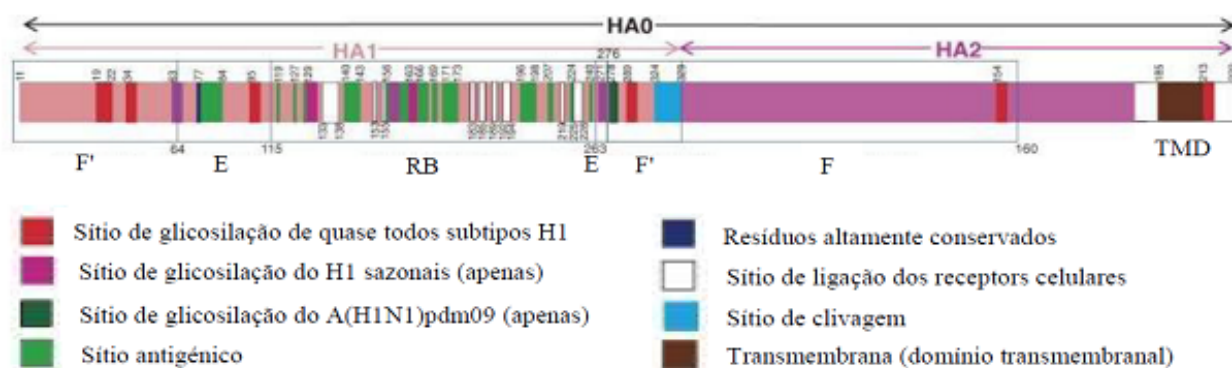


Figura 1.3: Representação esquemática do polipeptídeo da HA do subtipo A(H1N1). Cadeia linear da HA0, composta por HA1 e HA2, mostrando os três domínios: F, Fusão (F ' terminal da HA1 e F da HA2); E, esterase (entre F e RB); RB, ligação com os receptores (quase no meio da cadeia linear e no topo na estrutura complexa). TDM, domínio transmembranal. Adaptado de (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012).

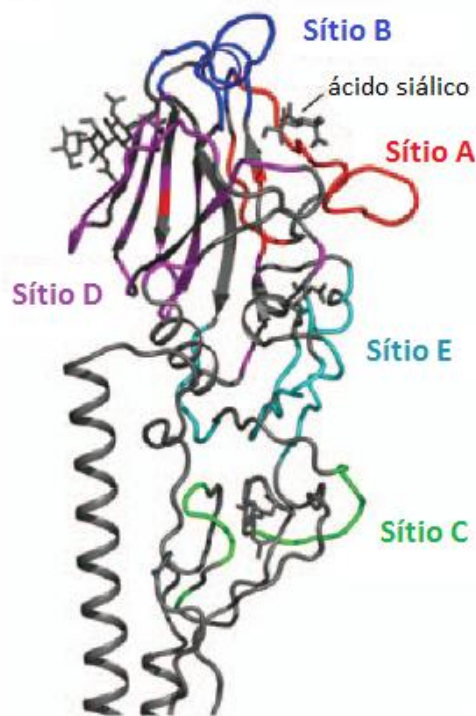


Figura 1.4: Estrutura antigênica da HA do vírus influenza A(H3N2) mostrando os cinco sítios antigênicos A-E mapeados na superfície da porção HA1. Os sítios antigênicos A (cor vermelha) e B (cor azul) estão localizados na parte superior da HA ao redor do sítio de ligação ao receptor. Adaptado de (Popova et al., 2012).

1.1.4. Mecanismos de variabilidade genética dos vírus influenza A

Os vírus influenza A apresentam uma elevada variabilidade genética e evoluem através de dois mecanismos básicos, denominados “drift” antigênico e “shift” antigênico. O “drift” antigênico ocorre devido às mutações pontuais inseridas pelo complexo RNA polimerase viral durante o processo de replicação em razão de sua baixa fidelidade, característica essa comum a todos os vírus RNA (Suzuki, 2005). Desse modo, o vírus é capaz de escapar da imunidade adquirida pelo hospedeiro em infecções anteriores, sendo este um mecanismo de variabilidade muito comum responsável por surtos e epidemias sazonais de influenza (Wright et al., 2007). Outro mecanismo de variabilidade viral, conhecido como “shift” antigênico, é responsável por gerar altos índices de morbidade e mortalidade que coincidem com as grandes pandemias de influenza. Este evento é caracterizado pelo aporte de material genético proveniente de cepas virais circulantes em aves ou suínos às amostras já adaptadas na população humana (Wright et al., 2007). O “shift” antigênico, portanto, ocorre devido ao rearranjo entre os fragmentos gênicos de vírus de origens distintas durante a infecção simultânea de duas partículas virais numa mesma célula (Barr et al., 2003).

1.1.5. Replicação viral

Os vírus influenza ligam-se aos resíduos de ácido siálico presentes na superfície das células para iniciar a infecção e posterior replicação (Figura 1.5). A adsorção do vírus influenza à superfície celular depende da ligação glicosídica entre o ácido siálico terminal e o penúltimo resíduo de galactose, que pode ser alfa2-3 ou alfa2-6. Desse modo, a interação do vírus influenza com uma molécula ubíqua como o ácido siálico é limitada pelos diferentes oligossacarídeos sializados presentes em diferentes espécies animais. Após a ligação à superfície da célula alvo e posterior endocitose, a acidificação do endossomo primário desencadeia uma mudança estrutural da porção HA2 da HA que induz à fusão entre o envelope do vírus e a membrana do endossomo, abrindo um poro que libera os RNPs virais no citoplasma da célula. O desencapsulamento efetivo do vírus influenza depende ainda da presença da proteína M2 que possui atividade de canal iônico (Hay, 1998). O fluxo de íons H⁺ pelo canal M2 do vírus influenza causa uma dissociação ácido induzida do RNP da proteína M1 (matriz), permitindo a migração dos RNPs livres no citoplasma para o núcleo através dos poros nucleares (Whittaker et al., 1996). Uma vez no núcleo, o complexo da polimerase viral inicia a transcrição e a replicação do RNAv. As proteínas virais, como a NP, o complexo RNA-polimerase e a M1 possuem sequência sinal de distribuição nuclear, enquanto as proteínas BM2 (influenza B), NA e HA (influenza A e B) são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER). No núcleo, as NPs e as proteínas do complexo RNA-polimerase associam-se aos ácidos ribonucleicos virais (RNAv) recém-sintetizados, formando as novas RNPs (Bergmann & Muster, 1996). As proteínas M1 migram até a membrana celular, posicionando-se na parte interna da bicamada lipídica, contendo as proteínas HA e NA (Palese & Shaw, 2007). A NA é fundamental durante a fase final da replicação, no brotamento dos vírus recém-sintetizados. Em razão de sua atividade sialidásica, a neuraminidase realiza a clivagem dos resíduos de ácido siálico da superfície da membrana celular, impedindo assim a aglomeração da progênie ou sua retenção na superfície da célula, devido à interação da HA viral com os resíduos siálicos (Nayak et al., 2004).

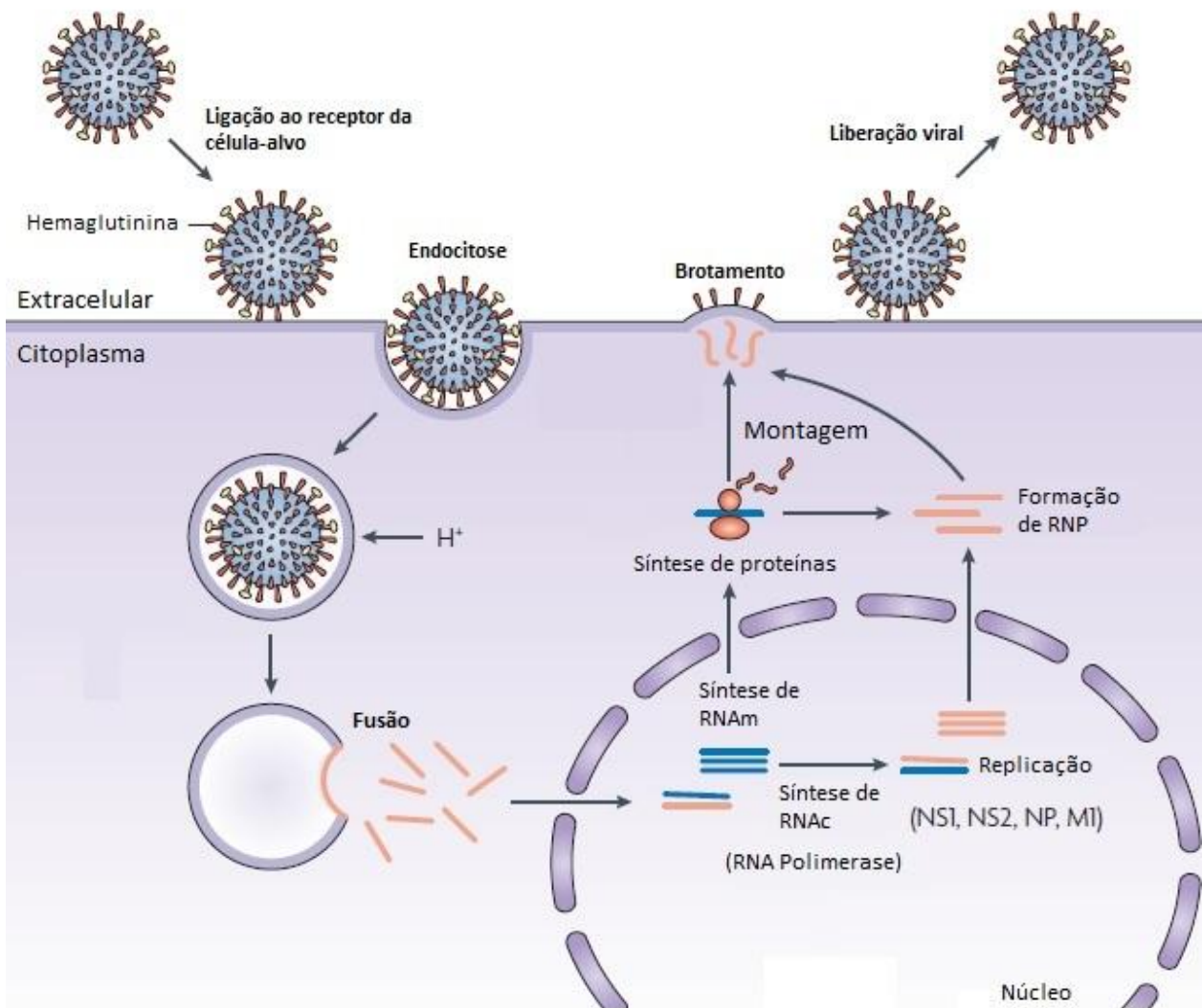


Figura 1.5: Figura esquemática do ciclo replicação do vírus influenza. Adaptado de (von Itzstein, 2007).

1.1.6. Epidemiologia da infecção pelos vírus influenza A

O vírus influenza A apresenta uma sazonalidade complexa com influência de um conjunto de fatores: populacionais (nível de imunidade, interações sociais, comportamentais e culturais), virais (contínuo processo de geração e seleção de novas linhagens) e ecológicos/ambientais (Lofgren et al., 2007). Os vírus influenza têm seu pico epidêmico nos meses de maio a setembro nas regiões de clima temperado do Hemisfério Sul, entre dezembro e março nas regiões de clima temperado do Hemisfério Norte, e durante todo o ano (com maior incidência no período chuvoso) nas regiões tropicais e subtropicais (Viboud et al., 2006, Tamerius et al., 2011) (Figura 1.6).

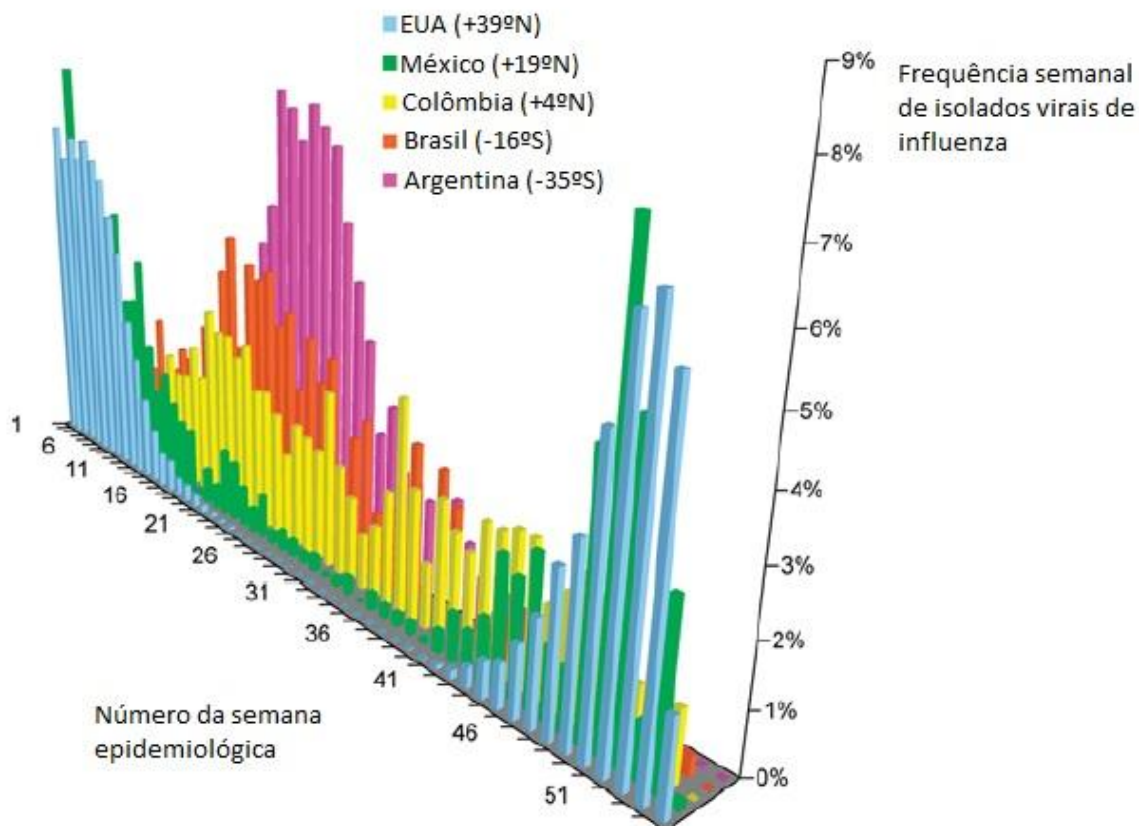


Figura 1.6: Comparação dos padrões de influenza sazonal nos países temperados e tropicais nas Américas. Adaptado de (Viboud et al., 2006).

Devido às dimensões continentais do Brasil, estendendo-se por áreas temperadas, subtropicais e equatoriais, com grandes diferenças climáticas, é possível identificar distintos padrões sazonalidade dos vírus influenza nas diferentes regiões do País (Motta et al., 2006b, Moura et al., 2009, Mello et al., 2009, SVS, 2009). A região Sul apresenta uma sazonalidade similar à observada nos países de clima temperado, com epidemias com pico no inverno (junho-julho) (Stralio et al., 2002). A região Norte apresenta dois picos, sendo o maior em associação ao período chuvoso (março-abril), como observado em países tropicais da Ásia (Moura et al., 2009). Já nas outras regiões do Brasil, temos uma situação intermediária, com casos detectados ao longo de todo ano e picos menos acentuados no inverno (Alonso et al., 2007). Entretanto, a descontinuidade e a falta de homogeneidade dos serviços de epidemiologia nas diferentes regiões do país dificultam muito a comparação entre os dados.

1.1.7. Pandemias ocasionadas pelos vírus influenza A

As pandemias de gripe ocorridas nos últimos dois séculos foram sabidamente ocasionadas a partir da circulação na espécie humana de novos subtipos do vírus influenza A, com os quais a população não havia tido contato prévio, e que foram provavelmente originados pelo rearranjo gênico entre as cepas humanas e as animais (Ferguson et al., 2003) (Figura 1.7).

A pandemia de 1918/1919, também conhecida popularmente como “Gripe Espanhola”, foi a primeira pandemia do século XX. Esta pandemia foi ocasionada pelo vírus influenza subtipo A(H1N1) e permanece como a mais severa pandemia documentada, levando à morte 25 milhões de pessoas de setembro de 1918 a março de 1919 (Taubenberger & Morens, 2006).

Em 1957, no sudeste da China, formou-se uma nova cepa emergente de influenza subtipo A(H2N2). Em seis meses o vírus havia se espalhado por todo o globo, com mais de um milhão de óbitos, ficando conhecida como “Gripe Asiática”. Esse vírus originou-se de um rearranjo entre segmentos gênicos de vírus humanos e vírus de origem aviária, que contribuíram com a porção HA2 do gene HA e a porção N2 do gene NA (Wright et al., 2007).

O vírus influenza subtipo A(H3N2) surgiu e substituiu completamente o subtipo A(H2N2) no ano de 1968. A provável origem do vírus da pandemia de 1968 foi no Sudeste da China e ocorreu devido ao rearranjo entre os segmentos gênicos de HA e PB1, provenientes de patos selvagens, e os outros seis segmentos do próprio subtipo A(H2N2). Esta nova pandemia ficou conhecida como “Gripe de Hong Kong”, e foi caracterizada por apresentar baixos índices de mortalidade, quando comparada com as duas pandemias anteriores. Isso provavelmente porque, embora o segmento gênico HA deste novo vírus, com origem aviária, possuísse menos de que 30% de homologia com o vírus antecessor, a população possuía anticorpos para o segmento N2 da NA sendo, portanto, o provável responsável para a gravidade moderada desse surto (Wright et al., 2007).

A partir de 1977, o subtipo A(H1N1) reapareceu na Rússia, tornando-se epidêmico (Wright et al., 2007). Entretanto, não substituiu o subtipo A(H3N2), passando esses dois subtipos de influenza A, juntamente com o vírus influenza B, a circular concomitantemente entre a população mundial. Normalmente um destes vírus sazonais predomina, tornando-se epidêmico em determinado ano (Hilleman, 2002).

Em 2009, ocorreu a emergência de uma nova linhagem de influenza A(H1N1). A primeira pandemia do século XXI foi ocasionada por um vírus com complexo rearranjo gênico: dois genes (PA e PB2) da linhagem aviária norte-americana; um gene (PB1) derivado da linhagem sazonal A(H3N2) que já circulava entre os humanos; três genes (HA, NP e NS) da linhagem suína

clássica norte-americana; e dois genes (NA e M) da linhagem suína euro-asiática. Este vírus provavelmente foi introduzido em um único evento na população mexicana e norte-americana (Dawood et al., 2009), com alta transmissibilidade entre humanos, desafiando toda a preparação mundial para uma esperada pandemia de influenza aviária (Belshe, 2009).

A China tem sido apontada como epicentro de origem de diversos subtipos virais pandêmicos (Tamerius et al., 2011), como A(H2N2) em 1957, A(H3N2) em 1968, a reemergência do A(H1N1) em 1977. Surtos epidêmicos de A(H5N1) e A(H9N2) em Hong Kong e recentemente A(H7N9) na China, além da alta densidade populacional e a estreita proximidade entre porcos e aves com o homem, mostram a importância de uma constante vigilância virológica nessa região (Liu et al., 2013).

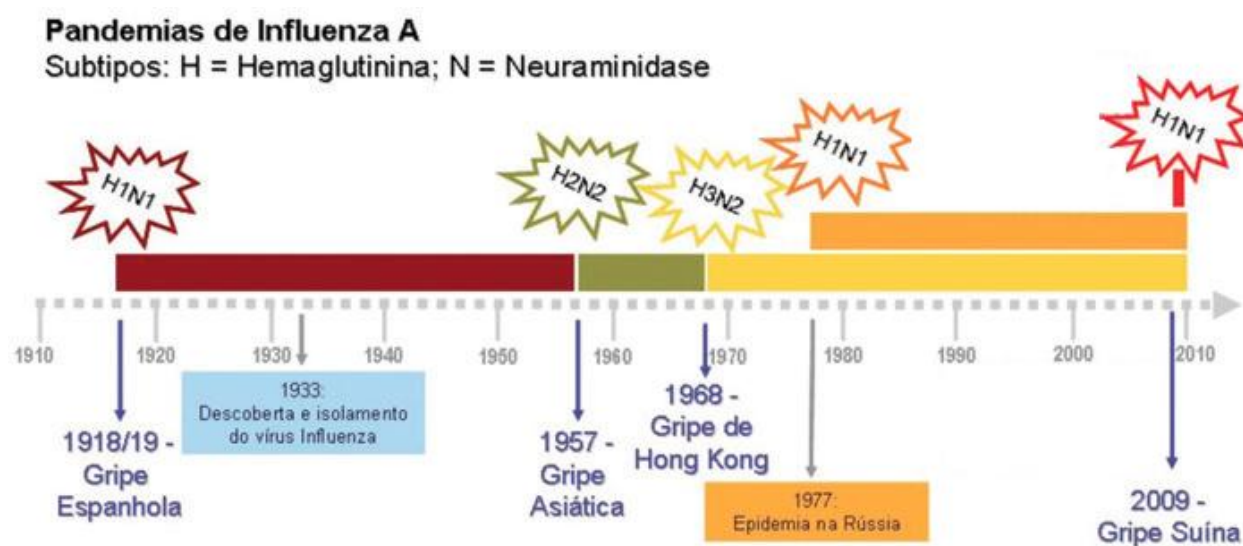


Figura 1.7: Linha do tempo mostrando o histórico das pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza A ocorridas nos séculos XX e XXI. Adaptado de (Siqueira et al., 2013).

1.1.8. Tratamento, prevenção e controle

Atualmente duas classes de antivirais (adamantanos e inibidores de NA) são licenciadas para o tratamento e profilaxia de infecções de influenza em humanos. Um papel crucial dos antivirais para atenuar uma pandemia de influenza é retardar a disseminação da infecção, enquanto uma vacina apropriada está em produção (Lowen & Palese, 2007). A eficácia dos antivirais na prevenção da transmissão é, portanto, de grande importância. Enquanto os adamantanos (amantadina e rimantadina) falharam nesse aspecto, devido à alta transmissibilidade de variantes resistentes aos medicamentos, os inibidores da neuraminidase (oseltamivir e zanamivir) mostraram-se mais promissores (Lowen & Palese, 2007). A aquisição e disseminação da resistência pode ser resultado da pressão seletiva exercida pelos antivirais, de mutações

pontuais espontâneas ou rearranjos gênicos e transmissão comunitária (De Clercq, 2006). Decorrente dessa preocupação sobre a disseminação de variantes resistentes, foram desenvolvidos vários outros NAIs que se acredita que possam suprir a demanda no caso de resistência aos NAIs atualmente usados. O desenvolvimento de drogas para alvos essenciais do ciclo replicativo do vírus estão em andamento, e pode, tanto em um tratamento combinado com os inibidores da neuraminidase ou sozinhos, fornecer novas alternativas de tratamento anti-influenza. A terapia combinada pode também reduzir a possibilidade do desenvolvimento de resistência (von Itzstein, 2007).

É claro que, embora as drogas anti-influenza resultem em um ganho de tempo e salvem vidas durante as pandemias, a vacinação é o caminho mais efetivo na redução da morbidade e mortalidade pelo vírus influenza e tem como objetivo controlar tanto epidemias sazonais como pandemias de influenza. Estão disponíveis, contra influenza, as vacinas inativadas trivalentes (TIVs), para injeção intramuscular, e vacinas "vivas" atenuadas trivalentes (LAIVs), para aplicação intranasal. As vacinas anti-influenza incluem cepas de dois subtipos de influenza A, sendo uma cepa do subtipo A(H1N1) e uma do subtipo A(H3N2), e uma cepa de influenza B (WHO, 2012). No Brasil, a primeira campanha de vacinação contra o vírus influenza aconteceu em 1999, com a disponibilização da vacina TIV em todo o território nacional, para os grupos de indivíduos selecionados para a imunização (Siqueira et al., 2013).

Os vírus influenza estão em constante evolução, e a medida que novas mutações são incorporadas na glicoproteína HA e esta deixa de ser reconhecida pelos anticorpos estabelecidos, novas cepas com potencial epidêmico surgem na comunidade. Por esta razão, vacinas antigas perdem sua eficácia e é necessário o contínuo monitoramento global e a frequente reformulação das vacinas anti-influenza (Fitch et al., 1997). As vacinas atualmente disponíveis para o controle dos vírus influenza têm sua composição antigênica revisada semestralmente para assegurar a eficácia da vacina ideal contra as cepas predominantes para os Hemisférios Norte e Sul (WHO, 2012). Apesar disso, a eficácia da vacinação varia de ano para ano como consequência da variação das distâncias antigênicas entre as cepas circulantes e as cepas vacinais (Deem & Pan, 2009). A eficácia da vacina tem uma correlação linear com a distância antigênica entre a cepa do vírus circulante e a cepa vacinal (Gupta et al., 2006), a qual pode ser estimada pelo número de mutações na sequência da HA (Smith et al., 2004).

A vacina trivalente particulada anti-influenza a despeito de ser amplamente utilizada na população possui limitações importantes. Ela contempla apenas uma cepa de cada subtipo de influenza A circulante em humanos e apenas uma linhagem do influenza B, além de necessitar de

atualizações constantes, fazendo com que sua produção em escala global resume-se a uma complexa corrida contra o tempo (Oxford, 2013). Uma alternativa, poderá ser as chamadas "vacinas universais", contra antígenos compartilhados entre todos os subtipos de influenza A ou linhagens de B (Lowen & Palese, 2007). Estas vacinas poderiam ser utilizadas na profilaxia durante os períodos inter-pandêmicos dispensando-se as atualizações semestrais, numa situação de pandemia por um vírus influenza A desconhecido, ou ainda, como um complemento às vacinas convencionais de HA/NA (Lowen & Palese, 2007). Atualmente, existem várias formulações experimentais de vacinas que induzem imunidade celular através de proteínas virais internas, matriz (M1 e M2) e nucleoproteína (NP), e para as regiões da haste da HA (porção HA2) que têm uma estrutura antigênica compartilhada entre os 17 subtipos diferentes dos vírus influenza A e influenza B (Kang et al., 2011). Estudos recentes demonstram que as vacinas que contêm vírus, cuja os domínios da cabeça globular da HA diferem substancialmente das cepas sazonais, são capazes de aumentar os títulos de anticorpos direcionados para a região da haste da HA. Além disso, os anticorpos anti-HA (região da haste), suscitados pela vacinação parecem ser de longa duração e, portanto, podem ser alvo para a geração de uma vacina universal (Miller et al., 2013).

Mundialmente, desde 1947, a vigilância dos vírus influenza é realizada através do Sistema Global de Resposta e Vigilância em Influenza ("Global Influenza Surveillance and Response System" - GISRS) e pela Rede de Vigilância Global em Influenza da OMS, criada em 1952. Esta rede consiste em Centros Colaboradores de Referência em Influenza (WHOCC) localizados nos Estados Unidos da América, Inglaterra, Japão, Austrália e China, um Centro Colaborador em Influenza Animal (EUA) e 136 laboratórios reconhecidos pela OMS como Centros de Referência Nacionais ("National Influenza Centres" - NIC) em 106 países (WHO, 2011).

O Brasil possui três NIC, um em São Paulo (Instituto Adolfo Lutz – IAL/SP), um em Belém (Instituto Evando Chagas – IEC/PA) e um no Rio de Janeiro (Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo – LVRS/IOC/Fiocruz/RJ), sendo este considerado pelo Ministério da Saúde como Centro de Referência Nacional em Influenza, aqueles Centros Regionais em Influenza (SVS, 2009). Todas as informações quanto a caracterização antigênica e/ou genômica, suscetibilidade ou resistência aos antivirais e vírus sementes para a produção de vacinas são obtidos por esta Rede de Laboratórios e reportadas aos WHO CC (Siqueira et al., 2013). No nível nacional, o sistema de vigilância visa orientar o desenvolvimento de políticas e ações de prevenção e controle através do fornecimento de dados de medição de carga e o impacto das infecções por

influenza. Localmente, orienta a tomada de decisões para a resposta imediata a surtos e ações voltadas ao tratamento dos pacientes (Siqueira et al., 2013).

1.2. Influenza A(H3N2)

O vírus influenza A(H3N2) emergiu durante a epidemia de 1968, provavelmente no Sudeste da China, e desde então tem circulado continuamente e predominantemente na população humana, sendo raras as epidemias onde outros subtipos foram predominantes, como 2009 por exemplo, ano da emergência do subtipo pandêmico A(H1N1)pdm09 (Ann et al., 2012). A indução de substanciais morbidade e mortalidade pelo vírus A(H3N2) humano durante as epidemias anuais, como as registradas em 2003 e 2004 (Ghedin et al., 2005), bem como o surgimento na população humana de uma nova variante rearranjada deste vírus em 2011 (Lindstrom et al., 2012) demonstram a plasticidade evolutiva do subtipo A(H3N2) e a sua capacidade de provocar epidemias extensas e importantes (Ann et al., 2012).

1.2.1. Evolução molecular do vírus influenza A(H3N2)

Com base em estudos evolutivos do segmento gênico da hemaglutinina (HA), principal antígeno de superfície dos vírus influenza, acredita-se que os três gêneros dos vírus influenza tenham um ancestral comum. Desse modo, os vírus influenza C teriam divergido primeiramente há aproximadamente 8000 anos, e os vírus influenza A e B, há cerca de 2000 e 4000 anos, respectivamente (Suzuki & Nei, 2002). Esse ancestral comum e a diferença de tempo entre o surgimento de cada um dos tipos explicariam as similaridades encontradas entre os gêneros influenza A e B, quando comparados ao gênero influenza C (Figura 1.8).

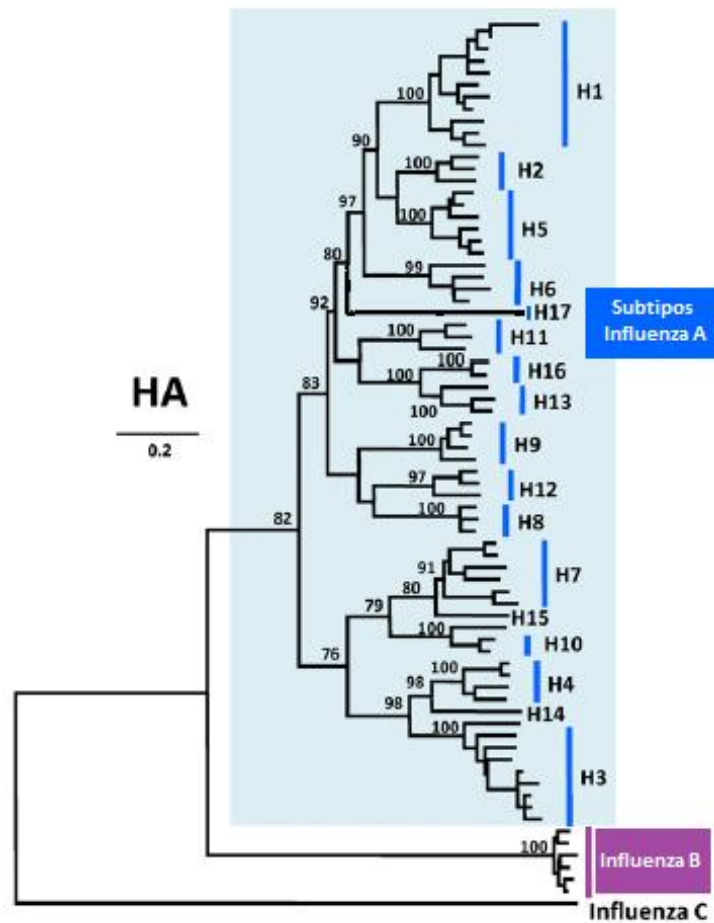


Figura 1.8: Árvore filogenética inferida pelo método ML para o segmento gênico da HA. Os valores de bootstrap são mostrados acima dos ramos dos nós principais, indicando os 17 subtipos de influenza A (marcados em azul) e o influenza B (em roxo). Adaptado de (Tong et al., 2012).

O gene HA do subtipo A(H3N2) evoluiu a partir de uma única linhagem ancestral desde sua introdução em 1968 na população humana, gerando um árvore filogenética com uma topologia bastante característica, com um tronco único central. Esse tronco principal retrata o histórico de mutações vantajosas que foram fixadas pela seleção natural através do tempo, agrupando mais próximo à raiz as cepas virais mais antigas, enquanto que os ramos laterais originados a partir do tronco central representam aquelas cepas virais que se extinguiram porque não foram suficientemente distintas a fim de evadir o sistema imune (Ferguson et al., 2003, Nelson & Holmes, 2007) (Figura 1.9).

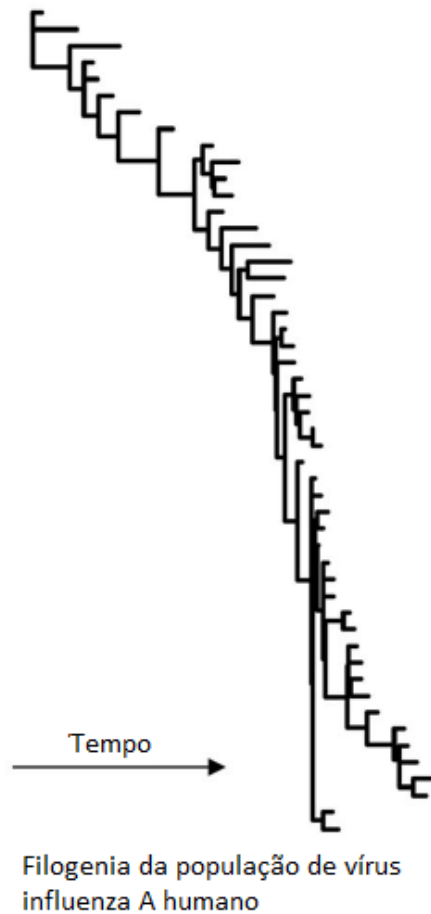


Figura 1.9: Filogenia do vírus influenza subtipo A(H3N2), gene HA (porção HA1), mostrando sua estruturação clássica com um tronco único. Adaptado de (Grenfell et al., 2004).

Embora essa estruturação da árvore filogenética do subtipo A(H3N2) revele gargalos periódicos na população viral, a presença destes gargalos não é em si uma evidência conclusiva para a evolução adaptativa, pois padrões filogenéticos semelhantes podem ser gerados através de extinções virais estocásticas, sem auxílio da seleção positiva. A assinatura definitiva de seleção positiva da proteína HA do subtipo A(H3N2) não é apenas a presença de um tronco principal, mas a elevada frequência de substituições não-sinônimas que são fixadas ao longo do mesmo (Nelson & Holmes, 2007). O gene HA do subtipo A(H3N2) evolui muito mais rapidamente do que os genes internos PB2, PB1, PA, NP e M1, provavelmente devido a maior pressão seletiva diversificadora do hospedeiro sobre a glicoproteína viral de superfície (Webster et al., 1992). A taxa de evolução da porção HA1 do gene HA do vírus influenza A(H3N2) foi estimada em $4,0 \times 10^{-3}$ substituições nucleotídicas/sítio/ano e $5,0 \times 10^{-3}$ substituições de aminoácidos/sítio/ano (Webster et al., 1992). As taxas de evolução das HAs são menores em seus reservatórios naturais,

ou seja, nas aves aquáticas migratórias, e mais aceleradas em hospedeiros mais recentes, como o homem. O gene HA evolui a uma taxa de substituição de aminoácidos dez vezes menor nos reservatórios naturais quando comparado com o mesmo subtipo viral no homem (Suzuki & Nei, 2002).

1.2.2. Dinâmica espaço-temporal dos vírus influenza A(H3N2)

Diversas análises sugerem que a dinâmica evolutiva do vírus influenza A(H3N2) é modelada pela complexa interação entre a alta taxa de mutação do vírus, os rearranjos frequentes, o fluxo gênico entre as distintas regiões geográficas e a seleção natural exercida pelo sistema imunológico dos hospedeiros.

Tem sido proposto que a diversidade genética global do subtipo A(H3N2) é resultado de um fluxo contínuo e unidirecional de linhagens virais de áreas tropicais do sudeste da Ásia para regiões temperadas dos Hemisférios Norte e Sul (Russell et al., 2008) (Figura 1.10A). Uma consequência necessária desse modelo é que a seleção de variação antigênica será muito mais eficiente nas regiões tropicais, onde o tamanho da população viral é mantido por uma taxa elevada de infecção basal e pela ausência dos graves gargalos de transmissão observados nas regiões temperadas, onde há uma sazonalidade restrita ao inverno. Assim, as mudanças genéticas e antigênicas do subtipo A(H3N2) em regiões temperadas são efeito da seleção dentro das regiões tropicais e do fluxo gênico proveniente das mesmas (Rambaut et al., 2008).

Outros estudos sugerem um modelo de disseminação espacial mais complexo, em que múltiplas regiões poderiam disseminar as amostras responsáveis pelas epidemias sazonais anuais nas regiões temperadas em um determinado ano (Bahl et al., 2011) (Figura 1.10B). Nesse modelo, nenhuma região geográfica seria capaz de atuar sozinha como fonte de variabilidade viral, e as epidemias sazonais nas regiões temperadas seriam disseminadas a partir de distintas regiões geográficas, inclusive a partir de outras regiões temperadas. Desse modo, epidemias no Hemisfério Norte poderiam ser disseminadas diretamente de regiões do Hemisfério Sul e vice-versa, e a manutenção dos vírus nas regiões tropicais dependeria da introdução constante de amostras circulantes nos períodos epidêmicos nas regiões temperadas.

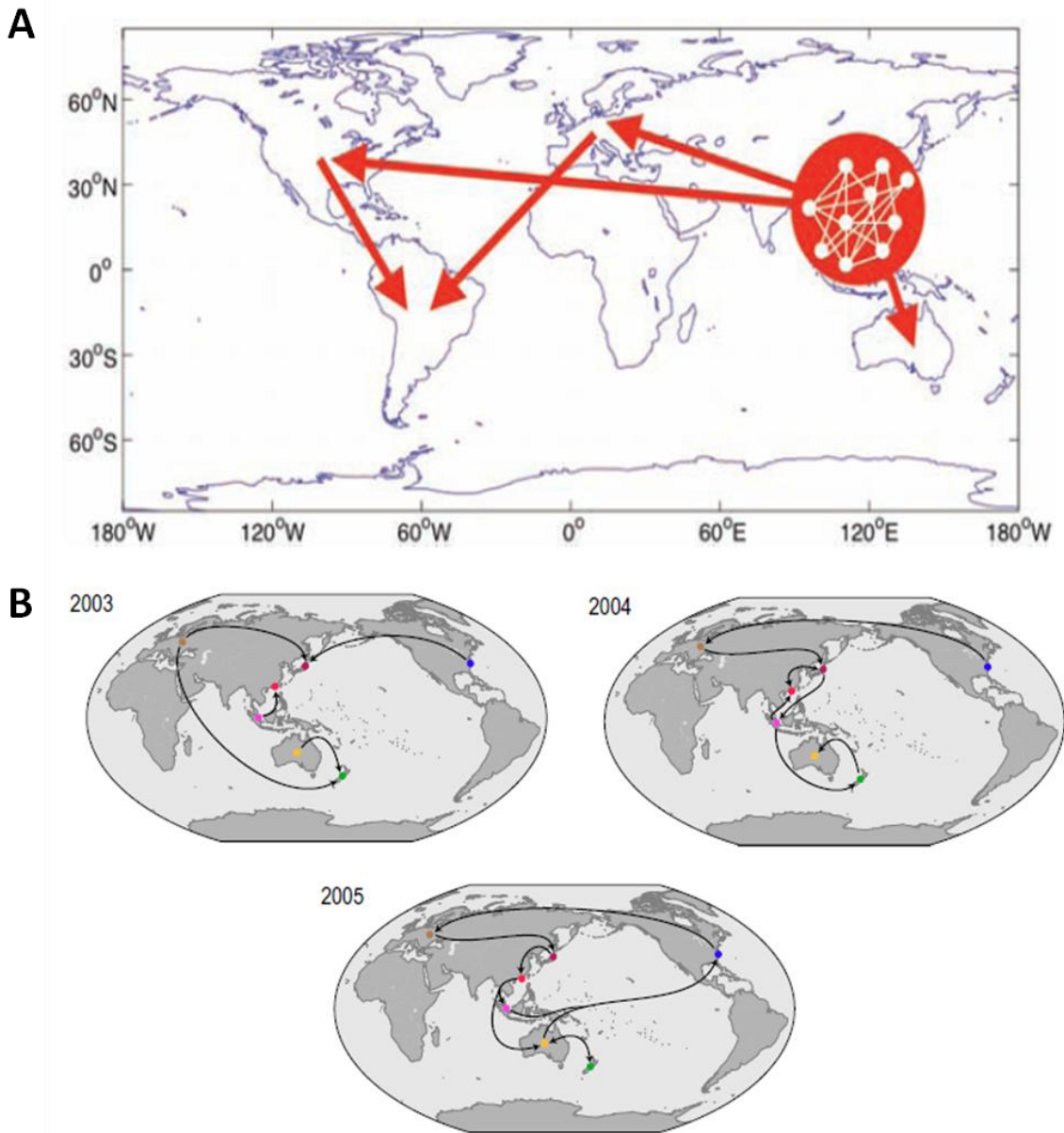


Figura 1.10: Modelos de disseminação propostos para o vírus influenza A(H3N2). Em A, modelo em que o sudeste Asiático atua como principal fonte de origem e disseminação (Russell et al., 2008). Em B, para cada período epidêmico, múltiplas regiões atuam como fonte disseminadora dos vírus influenza A(H3N2) (Bahl et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar as linhagens antigênicas do vírus influenza A(H3N2) que circularam no Brasil durante o período de 1999 a 2012 e reconstruir a sua origem, determinando os padrões de evolução e de disseminação geográfica.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a identidade antigênica e descrever as substituições de aminoácidos nos sítios antigênicos do gene HA nas diferentes linhagens de influenza A(H3N2) que circularam no Brasil, em comparação com os protótipos vacinais.
- Determinar a concordância entre as cepas vacinais e as linhagens antigênicas circulantes na população brasileira durante o período de estudo.
- Traçar padrões de ancestralidade das cepas de influenza A(H3N2) no Brasil comparando filogeneticamente sequências do gene HA obtidas ao longo do tempo nas diferentes regiões do Brasil com sequências obtidas em outras regiões do mundo no mesmo período.
- Estimar o fluxo de intercâmbio viral entre as diferentes regiões do Brasil, assim como entre o Brasil e outras regiões do mundo.
- Comparar a dinâmica evolutiva do vírus influenza A(H3N2) nas regiões temperadas (Sul) e tropicais (Sudeste e Nordeste) do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sequências de vírus influenza A(H3N2) brasileiras

O Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS/IOC-Fiocruz) é o Laboratório de Referência Nacional para influenza, integrando a Rede Nacional de Vigilância para influenza do Ministério da Saúde. Desta forma, o LVRS possui um banco de sequências de vírus influenza provenientes de amostras clínicas do trato respiratório de pacientes com síndrome gripal de um longo período de tempo, e que foram enviadas no escopo da vigilância sentinela de influenza ou para esclarecimento de surtos ou epidemias.

Para este trabalho, foram analisadas um total de 249 sequências brasileiras do domínio HA1 da HA de amostras clínicas de influenza A(H3N2) humano no período de 1999 a 2012 (Figura 3.1). Desse total, 153 foram provenientes do banco de dados do LVRS, incluindo: 89 sequências do período de 1999 a 2008, previamente obtidas, e 64 novas sequências do período de 2009 a 2012, geradas para este estudo (APÊNDICE A). O vírus influenza A(H3N2) não foi detectado durante o ano de 2008, que apresentou circulação do subtipo A(H1N1) e influenza B (APÊNDICE F). As sequências do LVRS foram combinadas com mais 95 sequências Brasileiras, com informação de Unidade Federativa (UF), disponíveis no "NCBI Influenza Vírus Sequence Database" (Bao et al., 2008) e GISAID EpiFlu ("Global Initiative on Sharing All influenza Data", <http://platform.gisaid.org/>). Foram acrescentadas, ainda, outras 13 sequências isoladas no Brasil, entre 1991 e 1997, disponíveis nos mesmos bancos de dados, porém sem informação de UF.

As amostras clínicas sequenciadas e utilizadas neste trabalho foram coletadas no escopo do Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica de influenza do Ministério da Saúde, além de ter ocorrido durante uma emergência em Saúde Pública, o que dispensa a aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos. A identidade de todos os pacientes foi preservada, uma vez que as amostras foram identificadas apenas pelo número de registro de entrada no banco de dados do LVRS.

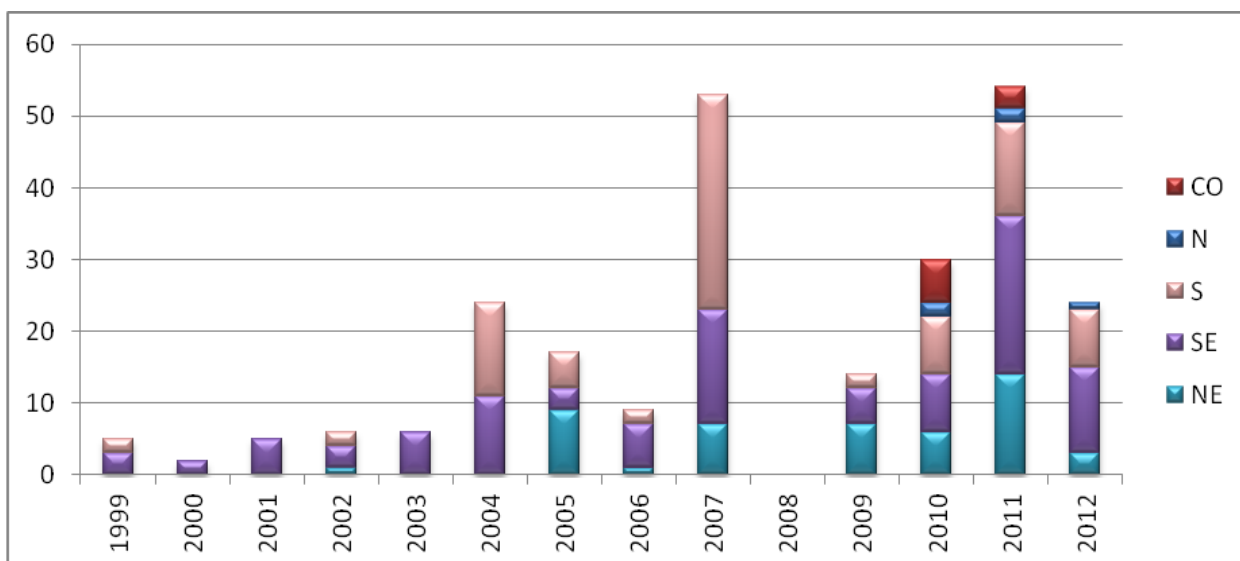


Figura 3.1: Quantitativo de sequências brasileiras por região e ano, utilizadas em nossas análises. Não há sequências disponíveis para o ano de 2008.

3.2. Sequências de referência de vírus influenza A(H3N2)

Para as análises evolutivas foram selecionadas todas as sequências do gene HA do vírus influenza A(H3N2), disponíveis no banco de dados "NCBI Influenza Vírus Sequence Database" e GISAID EpiFlu, isoladas nas seguintes regiões do mundo: América do Sul (exceto Brasil), América do Norte (Nova Iorque), Europa (Reino Unido), Ásia (Hong Kong) e Oceania (Austrália) durante o período de 1999 a 2012. Devido a grande quantidade de sequências disponíveis (200-700 sequências de cada região), criamos um subgrupo de sequências representativo da diversidade genética do vírus em cada região, utilizando a ferramenta CD-HIT (Huang et al., 2010), disponível em http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi. Aquelas sequências com uma identidade $\geq 99,5\%$ foram agrupadas e apenas a sequência mais antiga de cada grupo foi escolhida. Desta forma, o número final de sequências (APÊNDICE B) de cada região que foram incluídas nas análises evolutivas variou de 50 a 100, conforme se observa na figura 3.2.

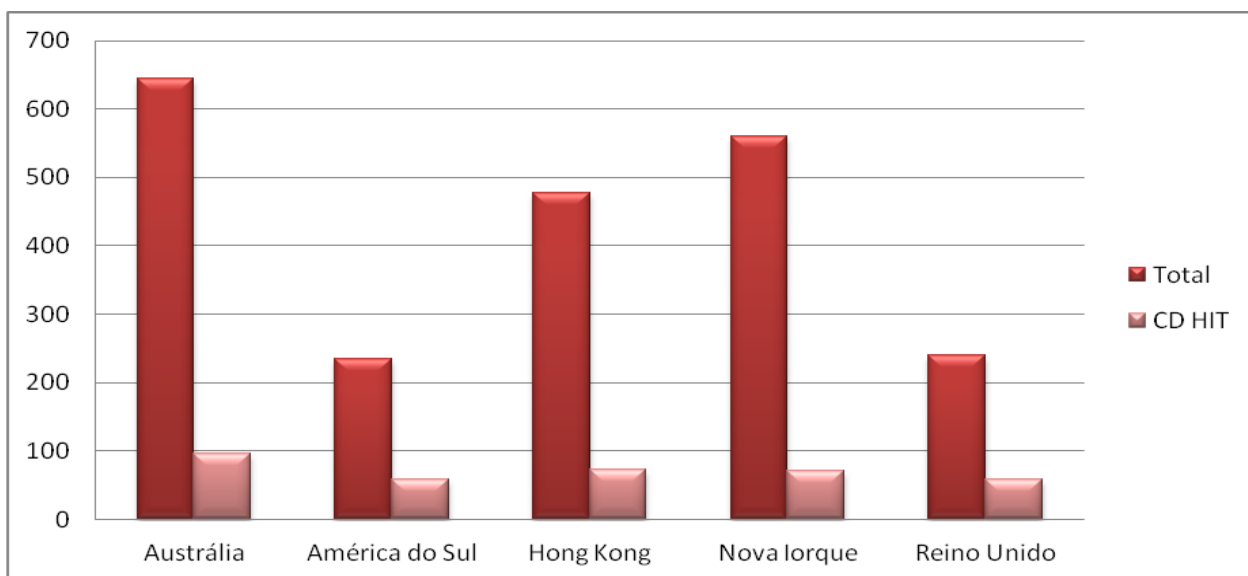


Figura 3.2: Total de seqüências do gene HA do vírus influenza A(H3N2) disponíveis nos bancos de dados do NCBI e GISAID e o total de seqüências utilizadas após a seleção através da ferramenta on line CD-HIT.

3.3. Extração do RNA

O RNA foi extraído a partir de 140µL da amostra clínica, utilizando o kit comercial QIAamp RNA Viral Mini Kit (Qiagen, Alemanha). A técnica foi realizada de acordo com os procedimentos baseados nas instruções do fabricante.

3.4. Amplificação e sequenciamento dos fragmentos gênicos da HA

As seqüências do segmento gênico da HA dos vírus influenza A(H3N2), já disponíveis no banco de dados do LVRS, foram obtidas através do protocolo utilizado anteriormente no LVRS (Motta et al., 2006a). A porção HA1 do segmento gênico da HA dos vírus influenza A(H3N2), do período de 2009 a 2012, foi amplificada e sequenciada conforme o protocolo utilizado pelo HPA ("Health and Protection Agency") (Galiano et al., 2012). A estratégia de amplificação baseia-se na realização de uma etapa de RT-PCR, utilizando as enzimas Superscript III RT e Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen/Life Technologies). Na RT-PCR, amplificamos um fragmento de aproximadamente 958 pares de bases (pb), fazendo uso dos iniciadores HAFUc e o H3A1R1056. Na reação de "Nested" PCR combinamos os iniciadores H3HAF6 com o iniciador H3CIIrev(938), gerando um produto de 932 pb. As seqüências dos iniciadores encontram-se descritas no Quadro 3.1.

Quadro 3.1: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de influenza A(H3N2) protocolo HPA

Nome	Sentido	Sequências (5'-3')
HAFUc	Direto	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G
H3A1R1	Reverso	GTC TAT CAT TCC CTC CCA ACC ATT
H3HAF6	Direto	AAG CAG GGG ATA ATT CTA TTA ACC
H3HAR1056	Reverso	GTT TCT CTG GTA CAT TCC GC
H3HAR650	Reverso	TTG GTC ACT GTC CGT ACT CGG GTG
AH3CIIrev(938)	Reverso	GCT TCC ATT TGG AGT GAT GC
AH3Bnew for(348)	Direto	AGC AAA GCT TAC AGC AAC TG

Para a realização da RT-PCR, utilizamos os seguintes componentes: 2,0µL dos iniciadores (direto e reverso) a 5pmol/µL (0,2µM); 7,5µL de tampão "10x Amp buffer with Pfx" (kit Pfx) (Invitrogen/Life Technologies); 0,5µL de inibidor de RNAses RNAsin (40U/µL) (Invitrogen/Life Technologies); 2,0µL de dNTPs (10mM); 1,0µL de MgCl₂ 50mM (kit Pfx); 23,5µL de água livre de DNAses e RNAses; 1,0µL de enzima Superscript III RT (200U/µL) (Invitrogen/Life Technologies); 0,5µL da enzima Platinum Pfx DNA pol 2,5U/µL (Invitrogen/Life Technologies). A esta mistura adicionamos 10,0µL do RNA. Após a mistura os componentes foram submetidos à amplificação com o auxílio de um termociclador, com a seguinte ciclagem: 50°C/30min (síntese do DNAc); 94°C/10min (denaturação); 35 ciclos de 94°C/30seg, 55°C/30seg, 68°C/2min (amplificação); 68°C/10min (extensão final).

Após a reação de RT-PCR, seguiu-se com uma reação "Nested" PCR cuja mistura continha: 2,0µL dos iniciadores a 5pmol/µL; 0,5µL da enzima Platinum Pfx DNA pol (Invitrogen/Life Technologies); 33µL de "10x Amp buffer with Pfx" (kit Pfx) (Invitrogen/Life Technologies); 1,0µL de MgCl₂ 50mM (kit Pfx) (Invitrogen/Life Technologies); 2,0µL de dNTPs (10mM) e 2,0µL de DNA. Depois da mistura, os componentes foram submetidos à amplificação por meio de um termociclador, com a seguinte ciclagem: 94°C/10min (denaturação); 35 ciclos de 94°C/30seg, 55°C/30seg, 68°C/2min (amplificação); 68°C/10min (extensão final).

Um volume de 5µL da reação de "Nested" PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,0% (E-Gel, Invitrogen/Life Technologies) para verificação dos produtos amplificados. Então, os produtos foram purificados através da utilização do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Alemanha), conforme instrução do fabricante. Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento com uso do Kit BigDye[®] Terminator v3.1 CycleSequencing (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento, utilizamos os iniciadores H3HAF6, H3HAR650, AH3CIIrev(938) e

AH3Bnew for(348) (Quadro 3.1) na concentração de 3,2 μ molar. O volume final da reação foi de 20 μ L e as condições de ciclagem foram 30 ciclos de 96°C/10seg, 50°C/5seg e 60°C/4min.

Posteriormente à reação, procedemos a um novo processo de purificação, utilizando o Kit de purificação BigDyeXTerminator[®] (Life Technologies). Os produtos purificados foram então submetidos ao analisador automático de DNA ABI 3130xl de 16 capilares (Life Technologies). Os eletroferogramas gerados foram analisados por meio do programa Sequencing Analises[®] (Life Technologies), com o qual foi avaliada a viabilidade das sequências obtidas. A montagem dos segmentos gênicos da HA foi realizada através do programa Sequencher[™] 5.0 (Gene Codes Corporation), com base em sequências referências específicas para o gene.

3.5. Alinhamento e análise filogenética dos fragmentos da porção HA1

As sequências nucleotídicas foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1997) implementado no programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) e pelo método Bayesiano, com uso do modelo de substituição nucleotídica mais apropriado, selecionado através do programa jModeltest (Posada, 2008). As árvores de ML foram reconstruídas pelo programa PhyML (Guindon & Gascuel, 2003), por meio do servidor "web online" (Guindon et al., 2005) e o algoritmo de busca heurística denominado "SPR branch-swapping". A confiabilidade da topologia obtida foi avaliada pelo método de "approximate likelihood-ratio test (aLRT)" (Anisimova & Gascuel, 2006), com base no procedimento de Shimodaira-Hasegawa, que compara a probabilidade da melhor e da segunda melhor alternativa de disposição em torno do ramo de interesse.

As árvores Bayesianas foram reconstruídas com o programa MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As cadeias de Markov (MCMC) correram por 20 x 10⁶ gerações e foram amostrados uma vez a cada 20.000 gerações. A convergência dos parâmetros nas análises Bayesianas foi avaliada através do cálculo de tamanho amostral efetivo (ESS), utilizando-se o programa Tracer v1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>), após excluir os 10% iniciais. A árvore Bayesiana com os Clados de Máxima Credibilidade ("Maximum Clade Credibility" – MCC) foi gerada com a ferramenta TreeAnnotator do programa BEAST (Drummond et al., 2012).

3.6. Análise de distância genética e antigenicidade

As distâncias de nucleotídeos entre as sequências brasileiras e as cepas vacinais foram calculadas através do modelo "Maximum Composite Likelihood" implementado no programa MEGA 5.0. Também foi calculado o número de diferenças de aminoácidos entre as sequências brasileiras e as cepas vacinais. Um valor de distância de nucleotídeos de 0,017 e um número de diferenças de aminoácidos de sete foram considerados como valores de identidade limítrofes para associar as cepas virais a algum dos protótipos vacinais descritos no Quadro 3.2. Uma distância de nucleotídeos de 0,0085 corresponde aproximadamente a uma diminuição de duas vezes no ensaio de Inibição de Hemaglutinação, equivalente a uma unidade antigênica, e são consideradas amostras com baixa associação com vacina, portanto, duas unidades são suficientes para que a vacina de influenza seja atualizada (Smith et al., 2004). Foi também realizada uma análise filogenética a partir das sequências de aminoácidos das cepas virais e dos protótipos vacinais pelo método de ML, pelo programa PhyML, como descrito anteriormente, após a escolha do melhor modelo de substituição de aminoácidos através do programa ProtTest (Abascal et al., 2005).

Ano	Cepa vacinal - Hemisfério Sul	Número de acesso NCBI ou GISAID
1999	A/Sydney/5/1997 (H3N2)-like	EF566075
2000	A/Moscow/10/1999 (H3N2)-like*	DQ487341
2001	A/Panama/2007/1999 (H3N2)-like	DQ508865
2002		
2003		
2004	A/Fujian/411/2002(H3N2)-like	EF541397
2005	A/Wellington/1/2004(H3N2)-like	CY012104
2006	A/California/7/2004(H3N2)-like	CY031795
2007	A/Wisconsin/67/2005(H3N2)-like	CY034116
2008	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like	CY035022
2009		
2010	A/Perth/16/2009 (H3N2)-like	GQ293081
2011		
2012		
2013	A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like	EPI377442

Quadro 3.2: A sequência A/Victoria/208/2009-like (EPI272062) também foi utilizada para as análises, a fim de definir os grupos antigênicos. * A vacina utilizada em 2000 foi na realidade A/Panama/2007/1999, devido a modificações nas recomendações da vacina.

3.7. Análises da estrutura temporal e geográfica das árvores filogenéticas

As análises de estruturação temporal e geográfica foram realizadas a partir da árvore Bayesiana de MCC. A estrutura temporal da árvore filogenética foi evidenciada pelo estudo da correlação entre a distância genética à raiz da árvore (divergência) e a data de isolamento de cada sequência, com o programa Path-O-Gen (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/pathogen/>). A estrutura geográfica da árvore foi investigada utilizando os testes estatísticos “Association Index” (AI), “Parsimony Score” (PS) e grupo monofilético (MC), implementados no programa BaTS (Parker et al., 2008). Este programa permite testar se a distribuição filogenética de um determinado grupo de caracteres (locais geográficos no nosso estudo), num conjunto de topologias possíveis produzidas a partir de uma análise Bayesiana, é completamente aleatória (*panmixis*) ou não. O valor de MC para cada local geográfico varia entre um e N, sendo N o número de sequências do respectivo local. Quanto maior o valor de MC, maior o grau de estruturação geográfica da árvore.

3.8. Análises evolutivas e filogeográficas

A taxa de evolução do gene HA assim como as possíveis rotas de dispersão do vírus influenza, foram simultaneamente estimadas usando o programa BEAST (Drummond & Rambaut, 2007). Para estas reconstruções, foi utilizado o melhor modelo de substituição nucleotídica, o modelo de coalescência “Bayesian Skyline plot” (Drummond et al., 2002, Drummond et al., 2005), um modelo de relógio molecular relaxado (Drummond et al., 2006), e um modelo de dispersão geográfica discreto e reversível (Lemey et al., 2009). Para identificar localidades com uma significativa relação epidemiológica, usamos o método de “Bayesian Stochastic Search Variable Selection” (BSSVS), que identifica a descrição mais parcimoniosa do processo de difusão filogeográfica e constrói um teste de fator de Bayes (BF) entre as localidades. Para quantificar o processo de disseminação, estimamos o número de transições entre as localidades na árvore de MCC assim como o cálculo de “Markov jump” (Minin & Suchard, 2008a, Minin & Suchard, 2008b), das transições de estado para os locais geográficos que apresentaram $BF > 5$ ao longo de todas as filogenias. As análises de MCMC correram por 25×10^7 gerações e foram amostradas uma vez a cada 25.000 gerações. A convergência dos parâmetros nas análises Bayesianas foi avaliada através do cálculo de ESS, utilizando o programa Tracer v1.5 após excluir os 10% iniciais. A árvore de MCC foi gerada com o programa TreeAnnotator e visualizada com o programa Figtree v1.3.1. Os eventos migratórios inferidos foram visualizados por meio do aplicativo SPREAD (Bielejec et al., 2011).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de linhagens antigênicas na população Brasileira

Para identificar as diferentes linhagens antigênicas circulantes na população brasileira no período de 1999 a 2012, foi realizada uma análise filogenética pelo método de ML com 261 sequências de vírus influenza A(H3N2), da porção inicial da HA1, totalizando 801 nucleotídeos. Esse total foi composto por: 237 sequências do Brasil com informação de UF de coleta, 11 sequências de cepas vacinais para o período de estudo (Quadro 3.2), e 13 sequências do Brasil do período de 1991 a 1997, sem informação sobre UF de coleta, que foram utilizadas para enraizar a árvore. A árvore de ML mostrou a existência de uma topologia em forma de escada característica do vírus influenza A, resultado da contínua extinção de linhagens e sua substituição por novas cepas virais ao longo do tempo (Figura 4.1).

Smith e colaboradores (2004) demonstraram que amostras com uma diminuição de reatividade da ordem de duas vezes no título de HI em relação à vacina tinham uma distância genética média (distância-p) $\geq 0,0085$. Logo, consideramos em nossas análises o valor de distância genética média de 0,017 (ou sete substituições de aminoácidos) como sendo a quantidade média de mutações acumuladas na HA que caracterizaria uma nova variante com baixa reatividade em relação à vacina estabelecida. Com base nos clados observados na árvore de ML (Figura 4.1) e nos cálculos de distância às cepas vacinais (APÊNDICES C e D), conseguimos estimar a identidade antigênica das sequências brasileiras durante o período de 1999-2012 (Figura 4.1 e Quadro 4.1).

Todos os ramos de transição entre linhagens antigênicas apresentaram um suporte significativo (aLRT $\geq 0,90$) e a maioria das mutações associadas aos ramos que dão origem às novas variantes são não-sinônimas e se localizam nas regiões dos sítios antigênicos da HA (Figura 4.1 e Quadro 4.2). Observamos ainda que a maioria (7/8) dos ramos de transição entre linhagens antigênicas no período de 1999-2012 está localizada no tronco da árvore, representando por variantes do vírus influenza A(H3N2) sobreviventes ao longo do tempo. A única exceção foi o ramo de transição para a linhagem A/Perth/16/2009-*like* (PE09), que está localizado em um sub-ramo lateral da árvore e parece representar uma linhagem extinta (Figura 4).

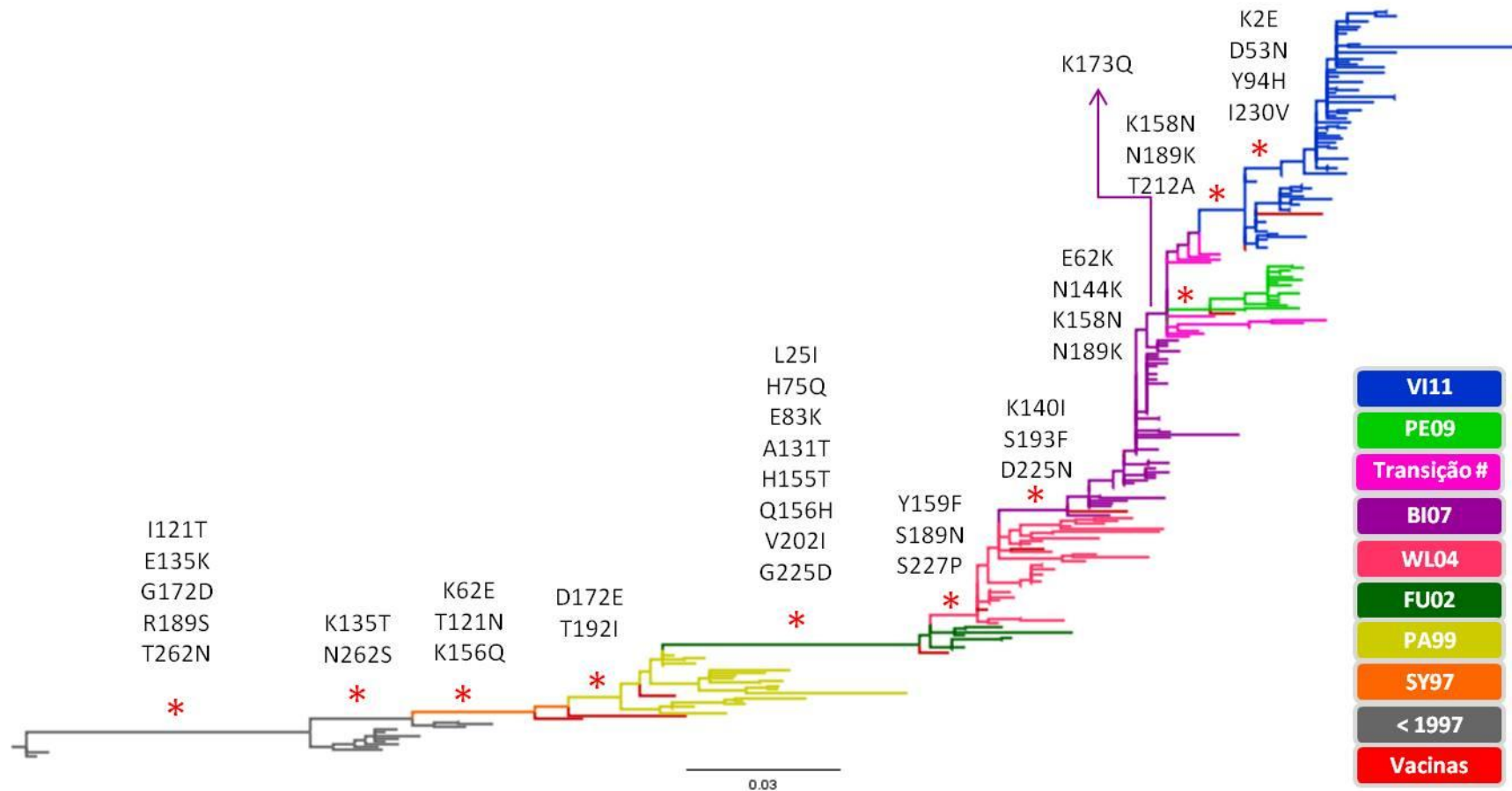


Figura 4.1: Árvore de ML com seqüências do Brasil de 1991-2012 e cepas vacinais de 1999-2013. As cores dos ramos da árvore indicam a identidade antigênica dos distintos grupos com base na sua relação com os correspondentes protótipos vacinais (vermelho), como se descreve na legenda à direita. As mutações acumuladas nos ramos de transição entre as diferentes linhagens antigênicas (asteriscos) estão indicadas. O modelo de substituição de aminoácidos escolhido, a partir da análise dos dados pelo ProTest, foi o HIVw+G. £ Sequências de 2009 apresentando padrão de seqüências transitórias.

Quadro 4.1: Identidade antigênica das variantes circulantes nas diferentes regiões do Brasil durante o período de estudo

Cepa Antigênica	PA99					FU02		WL04			BI07			PE09		VI11			
	1999	2000	2001	2002	2003	2003	2004	2004	2005	2006	2006	2007	2009	2010	2011	2009	2010	2011	2012
NE	-	-	-	1	-	-	-	-	8	1	-	7	7	6	-	-	-	11	3
SE	3	2	5	3	2	4	-	11	3	-	5	16	5	5	-	-	2	19	11
S	2	-	-	2	-	-	5	8	5	-	2	29	1	2	1	1	6	12	7
N														2	1	-	-	1	1
CO																-	5	3	-

NE, Nordeste; SE, Sudeste; S, Sul; N, Norte; CO, Centro-Oeste. PA99, A/Panama/2007/1999-like; FU02, A/Fujian/411/2002-like; WL04, A/Wellington/01/2004-like; BI07, A/Brisbane/10/2007-like; PE09, A/Perth/16/2009-like; VI11, A/Victoria/361/2011-like.

Quadro 4.2: Mutações em resíduos de aminoácidos identificadas nos eventos de diferenciação entre os clados e as suas distâncias respectivas.

Transição de Clado	Distância genética de aa*	Tronco da árvore	Substituições de aa identificados na diferenciação de clados					
			Sítio A	Sítio B	Sítio C	Sítio D	Sítio E	Outras regiões
SY97-PA99	11,4	X		T192I		D172E		
PA99-FU02	10,5	X	A131T	H155T Q156H			E83K H75Q	G225D V202I L25I
FU02-WL04	6,9	X		Y159F S189N		S227P		
WL04-BI07	7,1	X	K140I	S193F				D225N
BI07-PE09	7,3	-	N144K	K158N N189K			E62K	
BI07-VI11	4,7	X		K158N N189K		T212A		

SY97, A/Sydney/5/1997-like; PA99, A/Panama/2007/1999-like; FU02, A/Fujian/411/2002-like; WL04, A/Wellington/01/2004-like; BI07, A/Brisbane/10/2007-like; PE09, A/Perth/16/2009-like; VI11, A/Victoria/361/2011-like. * Estimativa da divergência evolutiva entre os grupos obtida a partir do número de diferenças (APÊNDICE E).

Foi possível verificar a circulação de uma única variante antigênica em alguns períodos (1999-2002, 2005, 2007 e 2012) e a cocirculação de duas variantes distintas em outros (2003, 2004, 2006 e 2009-2011) (Figura 4.2 e Quadro 4.1). Houve também diferenças entre as variantes virais circulantes nas distintas regiões em alguns anos. Em 2004, enquanto 100% das amostras sequenciadas na região Sul estavam associadas a FU02, no Sudeste foram identificadas tanto variantes FU02-*like* (42%) quanto WL04-*like* (58%) (Quadro 4.1). Em 2010 foram identificadas apenas amostras PE09-*like* nas regiões Norte e Nordeste, apenas amostras VI11-*like* na região Centro-Oeste, enquanto que nas regiões Sul e Sudeste foram identificadas amostras tanto PE09-*like* (71% e 25%, respectivamente) como VI11-*like* (29% e 75%, respectivamente) (Quadro 4.1).

4.2. Ajuste das cepas vacinais para as variantes virais que circulam no Brasil

Nossos dados mostraram que para alguns anos a composição da vacina não foi correspondente com as cepas virais circulantes (Figura 4.2). No ano de 1999, circularam variantes com identidade antigênica A/Panama/2007/1999-*like* (PA99), no entanto a vacina para esse período era A/Sydney/5/1997-*like* (SY97). No período de 2000 a 2003, as variantes virais circulantes apresentaram identidade antigênica com PA99, a vacina estava ajustada para esse grupo, tendo sido a PA99 a cepa vacinal administrada. Em 2003, já circulavam variantes distantes da PA99, mais próximas a A/Fujian/411/2002 (FU02), porém apenas em 2004 foi esta a cepa utilizada na vacina como representante do subtipo A(H3N2). Para o ano de 2004, verificamos algumas sequências com identidade antigênica com FU02 e A/Wellington/01/2004 (WL04). No ano subsequente, verificou-se que as amostras circulantes tinham identidade antigênica com WL04 estando de acordo com a cepa vacinal. Em 2006, circularam duas cepas antigenicamente distintas, uma relacionada à WL04 e outra à A/Brisbane/10/2007 (BI07) que foi a cepa vacinal de escolha no ano seguinte. Em 2007 e 2008, houve perfeita correspondência entre a cepa viral circulante e a cepa vacinal, WI05 e BI07 muito próximas antigenicamente. No ano de 2009, as cepas virais circulantes foram relacionadas antigenicamente com BI07, embora as sequências desse período apresentem-se fora do clado principal, mostrando um perfil transitório. Nos anos de 2010 e 2011, duas cepas circularam no Brasil, A/Perth/16/2009-*like* (PE09) e A/Victoria/361/2011-*like* (VI11), no entanto a cepa viral de influenza A(H3N2) contemplada na vacina para esse período foi a PE09. A cepa VI11 somente passou a compor a vacina trivalente para influenza para o Hemisfério Sul em 2013.

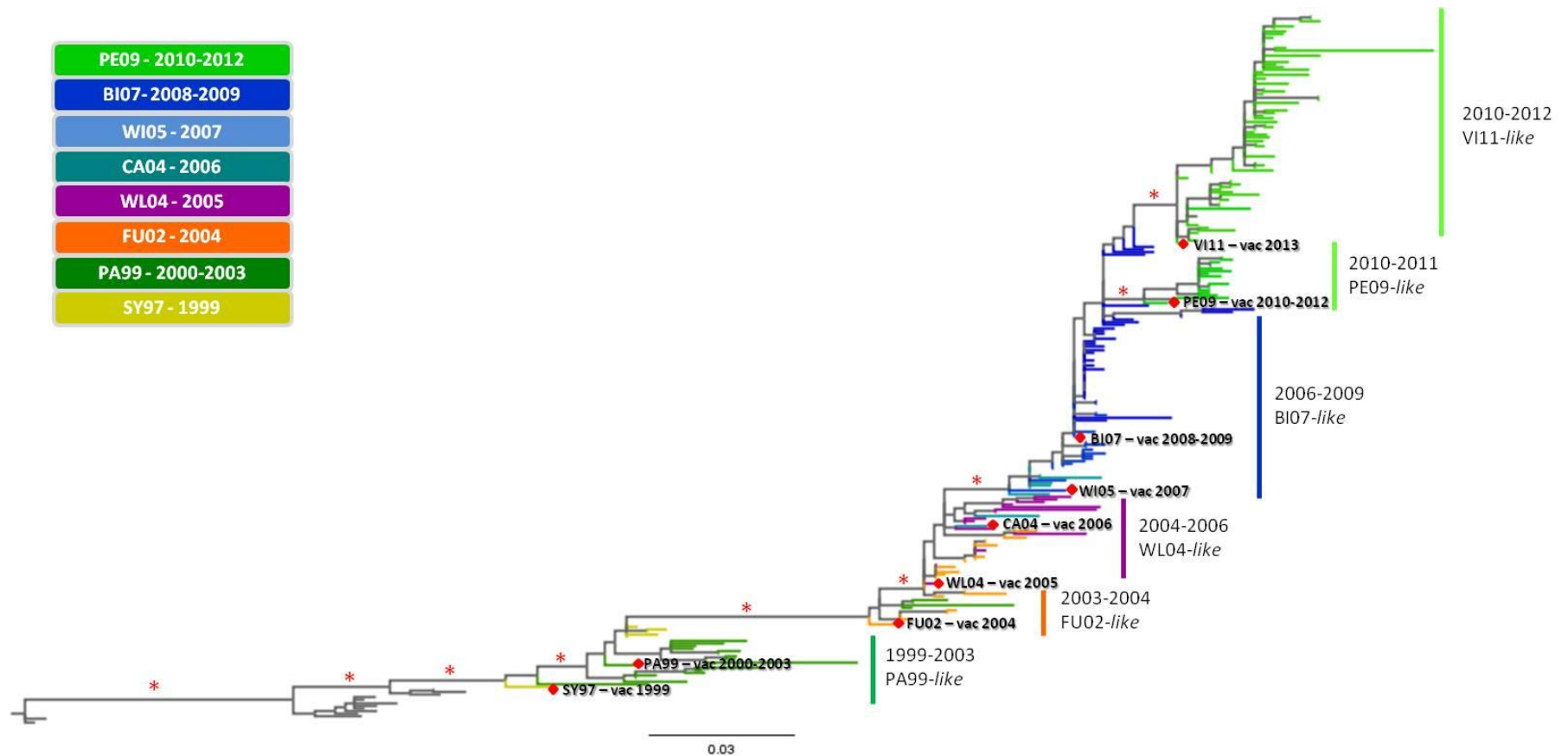


Figura 4.2: Árvore de ML com seqüências do Brasil, de 1991-2012, e cepas vacinais de 1999-2013 (círculo vermelho). As cores dos ramos da árvore indicam as cepas antigênicas, relacionadas às vacinas, e as seqüências dos anos em que a vacina foi utilizada, como descrito na legenda. A barra vertical indica o clado antigênico e a legenda ao seu lado, os anos das seqüências representadas no clado. O modelo de substituição de aminoácidos escolhido a partir da análise dos dados pelo ProTest foi o HIVw+G. * Ramos que dão origem a uma nova variante viral com suporte aLRT $\geq 0,90$.

4.3. Ajuste das cepas vacinais para o Hemisfério Sul.

O protótipo vacinal recomendado nas reuniões anuais para definição da vacina anti-influenza deve representar amostras circulantes em todas as regiões de um Hemisfério. Sendo assim, os distintos países do mesmo Hemisfério recebem a mesma recomendação de vacina a cada ano. Resolvemos, portanto, comparar o ajuste da vacina destinada ao Hemisfério Sul com as cepas virais que circularam no Brasil e na Austrália durante o período de 1999 a 2012. Para isto estimamos a distância genética média de nucleotídeos ("Maximum Composite Likelihood") entre os grupos de sequências de ambos os países e os protótipos vacinais utilizados a cada ano. Todas as sequências da Austrália disponíveis nos bancos de dados públicos foram selecionadas, as sequências com uma identidade de 100% foram agrupadas através do programa CD-HIT e apenas uma sequência de cada grupo foi escolhida. A partir desta análise, foi possível comprovar que as distâncias médias entre os grupos de sequências do Brasil e da Austrália às cepas vacinais usadas em cada ano foram similares (Figura 4.3).

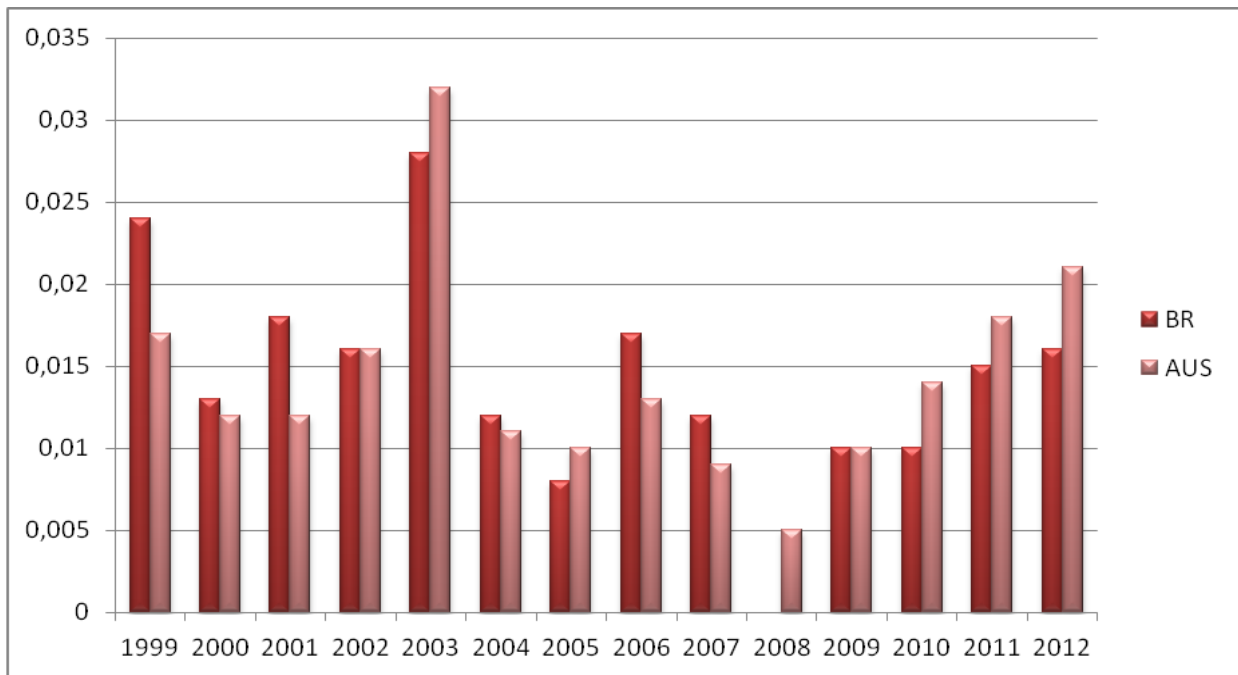


Figura 4.3: Análise de distância genética ("Maximum Composite Likelihood") entre os grupos de sequências do Brasil e da Austrália para cada ano do período abrangido nesse estudo. Para o ano de 2008 não há sequências brasileiras de influenza A(H3N2) disponíveis.

4.4. Seleção das sequências de referência

Inicialmente foram selecionadas todas as sequências provenientes de Nova Iorque (NY), Reino Unido (UK), Hong Kong (HK), Austrália (AU), e América do Sul (AS) disponíveis nos bancos de dados "NCBI Influenza Vírus Sequence Database" e GISAID EpiFlu. Devido ao grande quantitativo de sequências de influenza A(H3N2) disponíveis, foi necessário gerar um subconjunto representativo de cada região geográfica antes de realizar as análises evolutivas e filogeográficas. Para isto utilizamos a opção CD-HIT-EST, dentro da ferramenta on-line CD-HIT (Huang et al., 2010), que permite reduzir o número de sequências redundantes de forma a minimizar a perda de diversidade genética. A Figura 4.4 mostra as árvores de ML obtidas com o total de sequências disponíveis nos bancos de dados para cada região, com destaque para as sequências escolhidas após o uso do CD-HIT.

4.5. Análises da estrutura temporal e geográfica das árvores filogenéticas

Antes de proceder com as análises evolutivas e filogeográficas, verificamos a existência de estrutura temporal e geográfica no nosso conjunto de dados. Devido à quantidade reduzida de sequências das regiões Norte e Centro-Oeste, excluímos destas análises as 13 sequências provenientes destas regiões, assim como as 13 sequências brasileiras anteriores a 1999. As sequências do Brasil ($n = 234$) restantes foram alinhadas com aquelas provenientes das outras regiões geográficas previamente selecionadas ($n = 350$) e submetidas a uma análise com o programa MrBayes. A inspeção visual da árvore Bayesiana revelou uma forte estrutura temporal (Figura 4.5A), de forma que sequências do mesmo período tendem a formar clusters monofiléticos separados das sequências dos outros períodos. A análise de regressão linear permitiu comprovar uma excelente correlação entre a distância genética à raiz da árvore e o ano de amostragem da sequência ($R = 0,98$), compatível com a teoria do relógio molecular (Figura 4.5B).

Enquanto a estruturação temporal das sequências foi muito clara, não ocorreu o mesmo com a estruturação geográfica. A árvore Bayesiana mostra uma grande mistura de sequências de diferentes regiões sugerindo a existência de um modelo de *panmixis* (distribuição completamente aleatória das sequências de distintas regiões na árvore filogenética) (Figura 4.6). Com intuito de comprovar a hipótese de *panmixis*, analisamos as topologias das árvores no BaTS. Esta análise rejeitou a hipótese de *panmixis* no nível global e revelou um grau de estruturação geográfica significativa para as diferentes regiões do Brasil, AU, HK, e AS (Tabela 4.1).

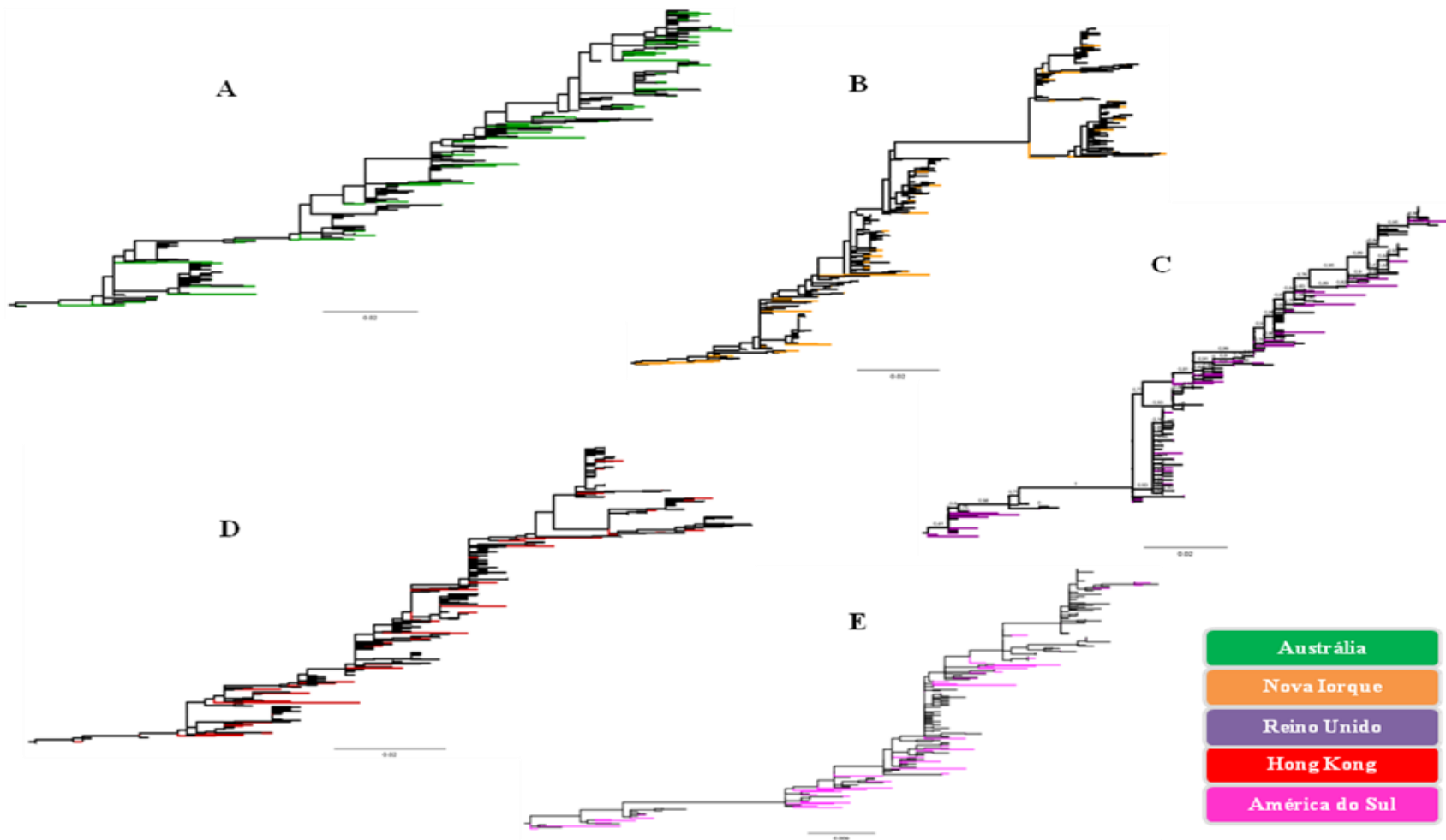


Figura 4.4: Análise de ML de todas as seqüências da porção HA1 do gene hemaglutinina do vírus influenza A(H3N2), do período de 1999 a 2012, disponíveis para cada região geográfica considerada neste estudo. As seqüências de cada região selecionadas pela ferramenta CD-HIT para compor as análises subsequentes estão destacadas em cor, como se indica na legenda à direita. Foi utilizado o modelo de substituição de nucleotídeo HKY+I+G para construir as árvores no PhyML para cada uma das regiões. A) Austrália; B) Nova Iorque; C) Reino Unido; D) Hong Kong; E) América do Sul.

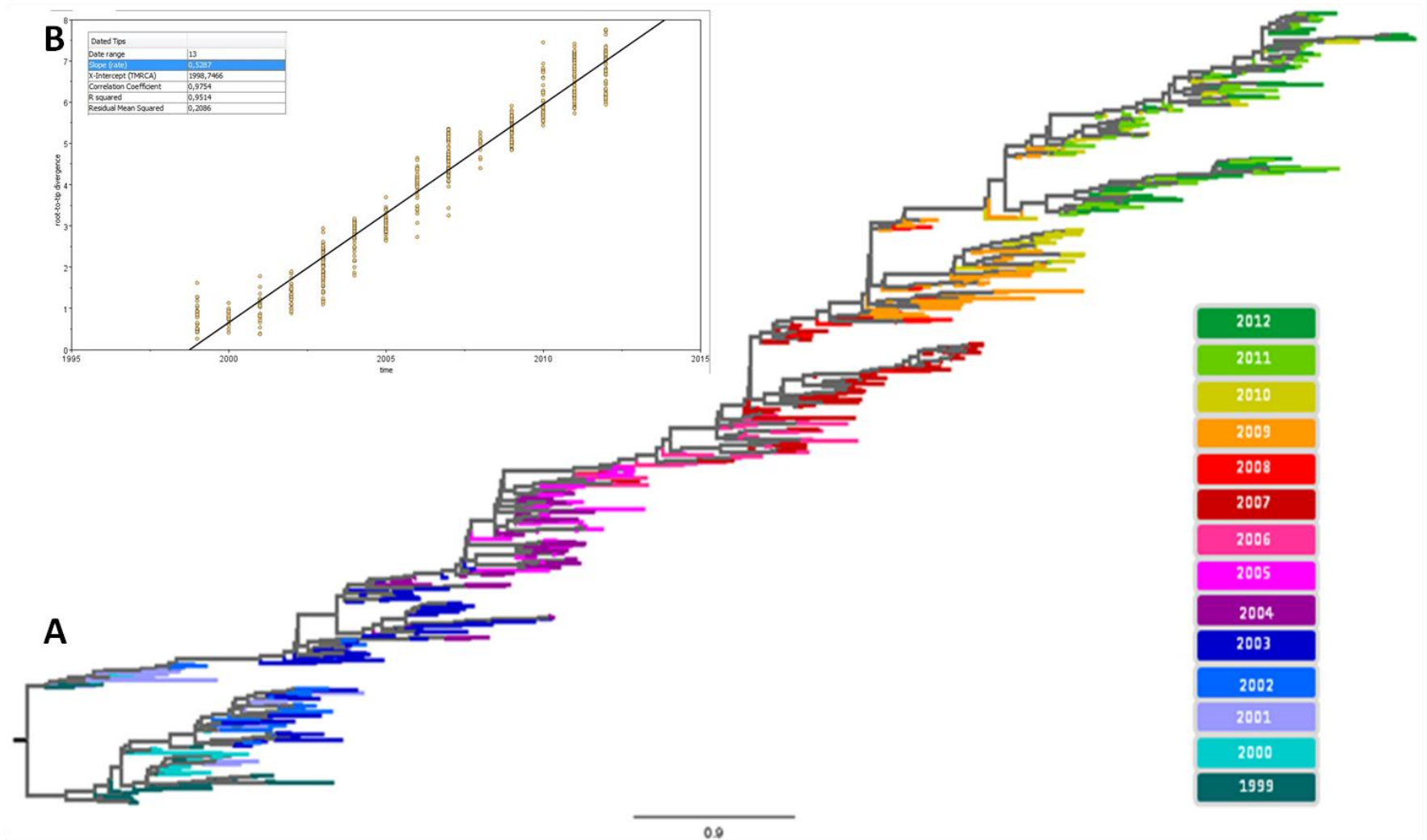


Figura 4.5: (A) Árvore de MCC construída com o MrBayes com as sequências de vírus influenza A(H3N2) para o período de 1999 a 2012. Os ramos foram codificados com uma cor para cada ano, demonstrando a estrutura temporal das sequências. O modelo de substituição de nucleotídeos escolhido após análise com o jModelTest foi GTR+I+G. (B) Análise de correlação linear entre a distância genética à raiz da árvore e o ano de amostragem da sequência através da ferramenta Path-O-Gen ($R = 0,98$).

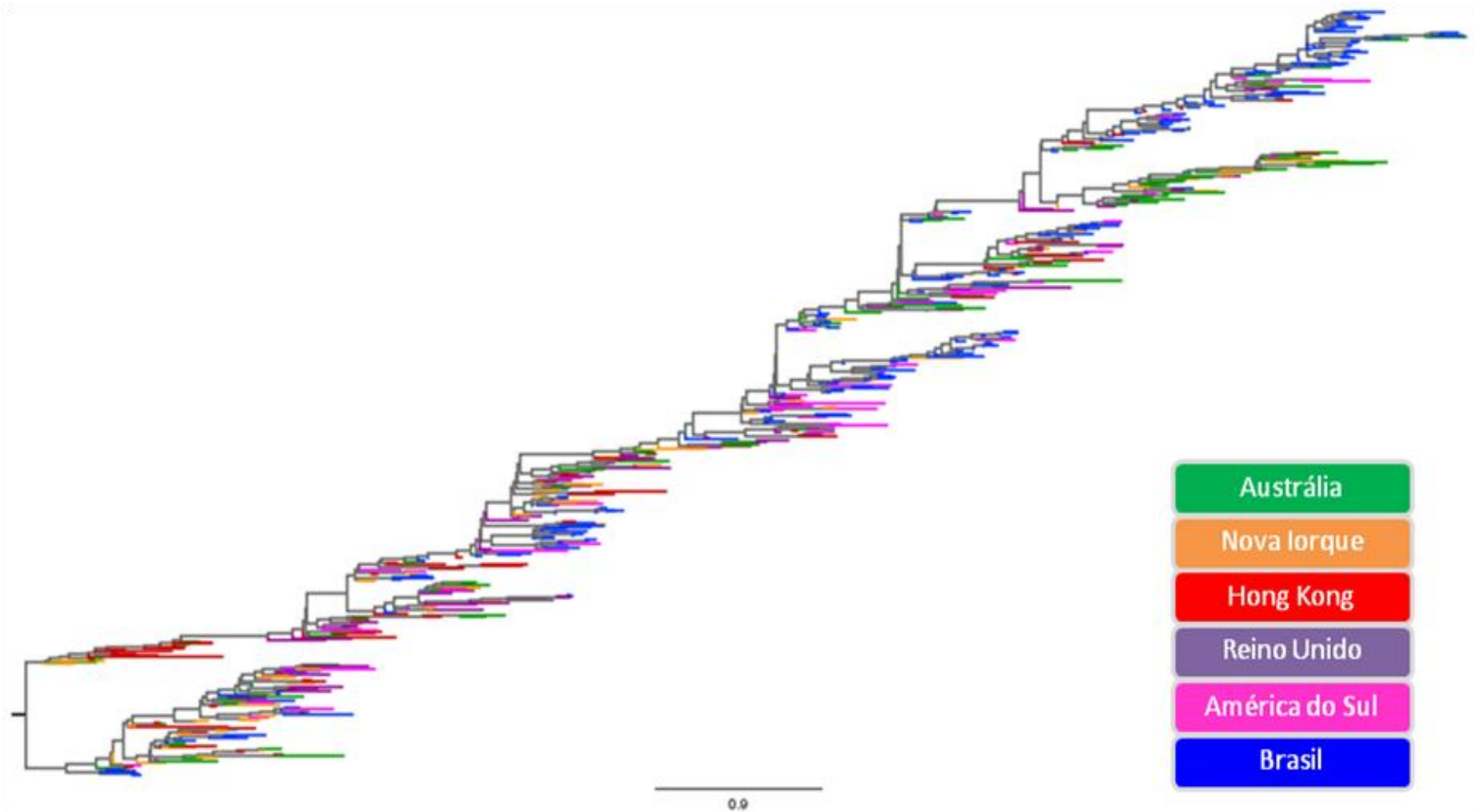


Figura 4.6: Árvore de MCC construída com o MrBayes com as sequências de vírus influenza A(H3N2) para o período de 1999 a 2012. O modelo de substituição de nucleotídeos escolhido após análise com o jModelTest foi GTR+I+G. Os ramos foram codificados por uma cor diferente para cada região. Verde, Austrália; laranja, Nova Iorque; vermelho, Hong Kong; roxo, Reino Unido; rosa, América do Sul; azul, Brasil.

Tabela 4.1: Análise estatística de estruturação geográfica para as sequências de influenza A(H3N2) realizada com o programa BaTS

Teste estatístico	Média Observada (95% CI)	Média Esperada (95% CI)	P-value
AI	36,0 (33,7-38,3)	50,4 (49,0-52,0)	0,0
PS	307,2 (301,0-314,0)	399,0 (390,6-406,3)	0,0
MC (BR NE)	5,0 (5,0-5,0)	1,7 (1,3-2,1)	0,0019
MC (BR SE)	4,3 (4,0-6,0)	2,4 (2,1-3,1)	0,0099
MC (BR S)	5,7 (5,0-8,0)	2,2 (1,9-3,0)	0,0040
MC (AU)	4,5 (4,0-7,0)	2,3 (2,0-3,0)	0,0059
MC (HK)	4,5 (4,0-6,0)	2,0 (1,6-2,7)	0,0040
MC (NY)	2,2 (2,0-3,0)	2,0 (1,6-2,3)	0,5160
MC (UK)	2,2 (2,0-3,0)	1,9 (1,5-2,2)	0,3939
MC (AS)	3,0 (3,0-3,0)	1,9 (1,4-2,2)	0,0139

BR NE, Nordeste do Brasil; BR SE, Sudeste do Brasil; BR S, Sul do Brasil; AU, Austrália; HK, Hong Kong; NY, Nova Iorque, UK, Reino Unido, AS, América do Sul.

4.6. Análises evolutivas e filogeográficas

Para descrever a dinâmica evolutiva e os padrões de migração do vírus influenza A(H3N2) nas regiões temperadas (Sul) e tropicais (Sudeste e Nordeste) do Brasil, sequências obtidas do Brasil e de outras regiões do mundo no mesmo período foram analisadas no programa BEAST. A taxa de evolução estimada para a porção HA1 do gene HA do vírus influenza A(H3N2) foi de $5,1 \times 10^{-3}$ substituições/sítio/ano (95%: $4,4 - 5,8 \times 10^{-3}$ substituições/sítio/ano). A reconstrução da dinâmica espaço-temporal de disseminação do vírus influenza A(H3N2) indica que diversas regiões estão presentes no tronco da árvore e na raiz das novas linhagens antigênicas (Figura 4.7); embora HK apareça como a região com maior probabilidade acumulada (1,91) de se localizar na raiz dos grupos antigênicos do vírus influenza A(H3N2), seguido por AU (1,11), UK (0,94), AS (0,53) e NY (0,32) (Tabela 4.2). O Brasil foi o local com menor probabilidade acumulada de se localizar no tronco da árvore (Figura 4.7) e na raiz dos grupos antigênicos (Tabela 4.2), mostrando assim que as variantes que circulam no Brasil seriam principalmente originárias de outras regiões. A estimativa da data de emergência do ancestral comum mais recente (tMCRA) de cada linhagem antigênica revela que o tempo médio entre a emergência de uma nova variante e sua detecção no Brasil é normalmente ≥ 2 anos (Tabela 4.2).

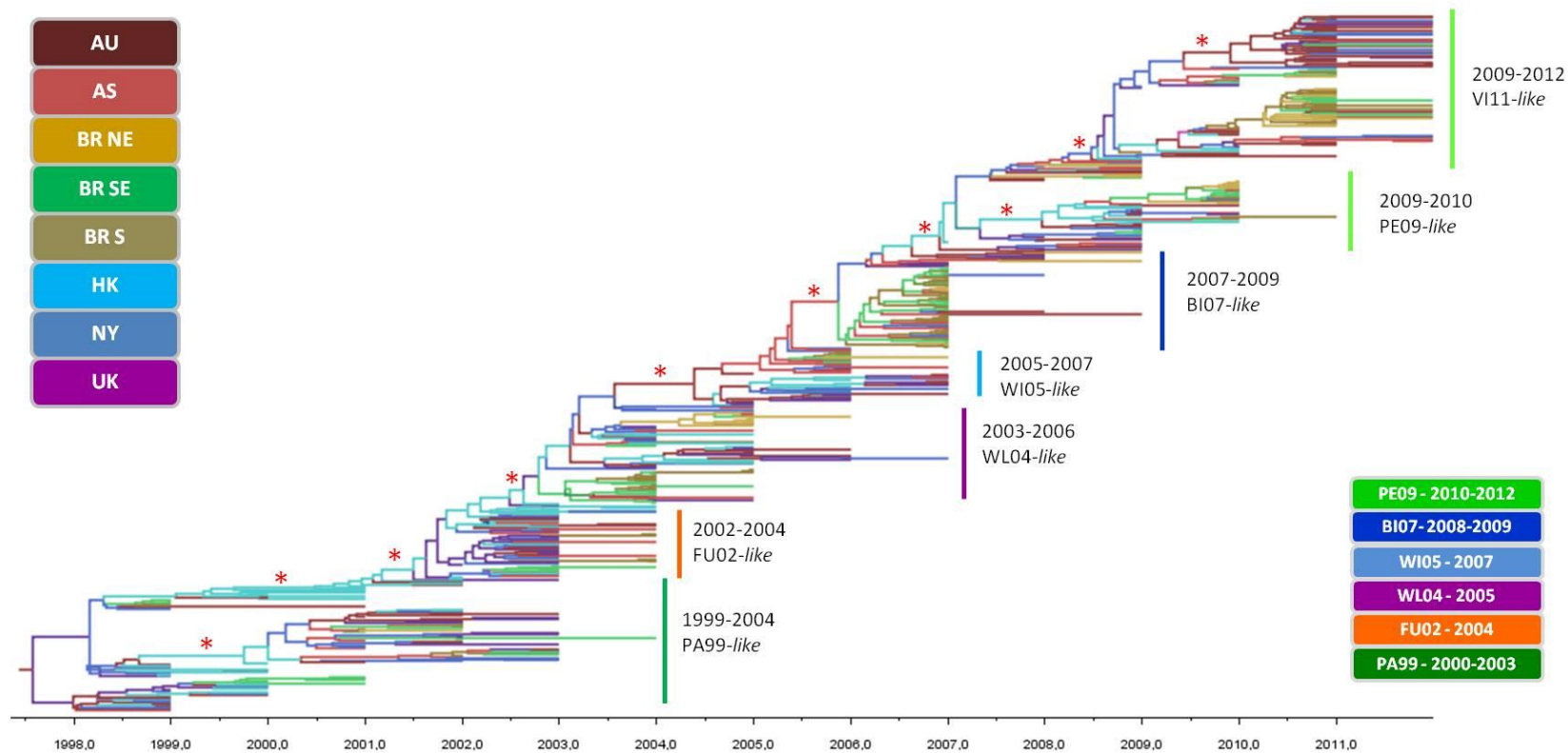


Figura 4.7: Árvore de MCC construída com o BEAST com as sequências de vírus influenza A(H3N2) para o período de 1999 a 2012. O modelo de substituição de nucleotídeos escolhido, após análise com o jModelTest, foi GTR+I+G. Os ramos foram codificados por uma cor diferente para cada região. A barra vertical indica o clado antigênico e a legenda ao seu lado os anos das sequências representadas no clado.
 * Clados chave com probabilidade posterior $\geq 0,90$.

Tabela 4.2: Local e data (tMRCA) de emergência das diferentes linhagens antigênicas do vírus influenza A(H3N2).

Grupo antigênico	Clado filogenético	tMRCA (95% CI) ^a	Local de origem	Probabilidade posterior (PP) do local de origem ^b	Identificação no Brasil	Introdução da vacina no Brasil
PA99	1999-2004	1997 (1996-1998)	AU/HK/UK	0,26/0,25/0,22	1999	2000
FU02	2002-2004	2001 (2001-2001)	HK/AU	0,60/0,24	2003	2004
WL04	2003-2006	2002 (2002-2002)	HK/AU/UK	0,42/0,22/0,22	2004	2005
WI05	2005-2007	2004 (2004-2004)	AU/HK/UK	0,39/0,28/0,22	2006	2007
BI07	2007-2009	2005 (2005-2006)	AS	0,53	2007	2008
PE09	2009-2010	2007 (2007-2009)	HK	0,36	2010	2010
VII1	2009-2012	2008 (2008-2008)	NY/UK	0,32/0,28	2010	2013

PA99, A/Panama/2007/1999-like; FU02, A/Fujian/411/2002-like; WL04, A/Wellington/1/2004-like; WI05, A/Wisconsin/67/2005; BI07, A/Brisbane/10/2007-like; PE09, A/Perth/16/2009-like; VII1, A/Victoria/361/2011-like. AU, Austrália; HK, Hong Kong; NY, Nova Iorque, UK, Reino Unido, AS, América do Sul. ^a Tempo médio do ancestral comum mais recente e estimativa do intervalo de credibilidade. ^b Unicamente locais com valores de probabilidade posterior > 0,20 estão indicados.

Nossos resultados da reconstrução filogeográfica demonstram um grande número de migrações no nível global com trocas entre todas as regiões analisadas (Figura 4.8A), como é de se esperar para o vírus influenza. A análise de BSSVS aponta a existência de relações epidemiológicas significativas entre: UK/NY (BF = 69), AS/NY (BF = 26), AU/UK (BF = 14), AU/HK (BF = 8), e AS/Brasil (região Sudeste) (BF = 6) (Figura 4.8B). Esta análise também demonstrou uma forte relação epidemiológica entre as regiões Sul/Sudeste (BF = 23754) e Sul/Nordeste (BF = 5) do Brasil, mas não entre as regiões Sudeste/Nordeste (BF < 3) (Figura 4.8B).

As estimativas dos fluxos de migração do vírus influenza A(H3N2) entre as diferentes regiões geográficas abrangidas nesse estudo foram realizadas através da contagem do número de eventos migratórios entre as áreas geográficas na árvore de MCC resultante da análise no BEAST (Figura 4.9). Esta estimativa indica que os maiores fluxos gênicos ocorreram entre AU/HK/NY/UK. Também houve um fluxo importante entre NY/AS e AS/Brasil (Figura 4.9A). Já as trocas do Brasil com outras regiões foram muito limitadas. A principal porta de entrada do vírus influenza A(H3N2) no Brasil parece ser a região Sudeste seguida pela região Sul e por último a região Nordeste (Figura 4.9B). Dentro do Brasil, o maior fluxo parece acontecer entre as regiões Sudeste e Sul, assim como do Sul para o Nordeste (Figura 4.9B).

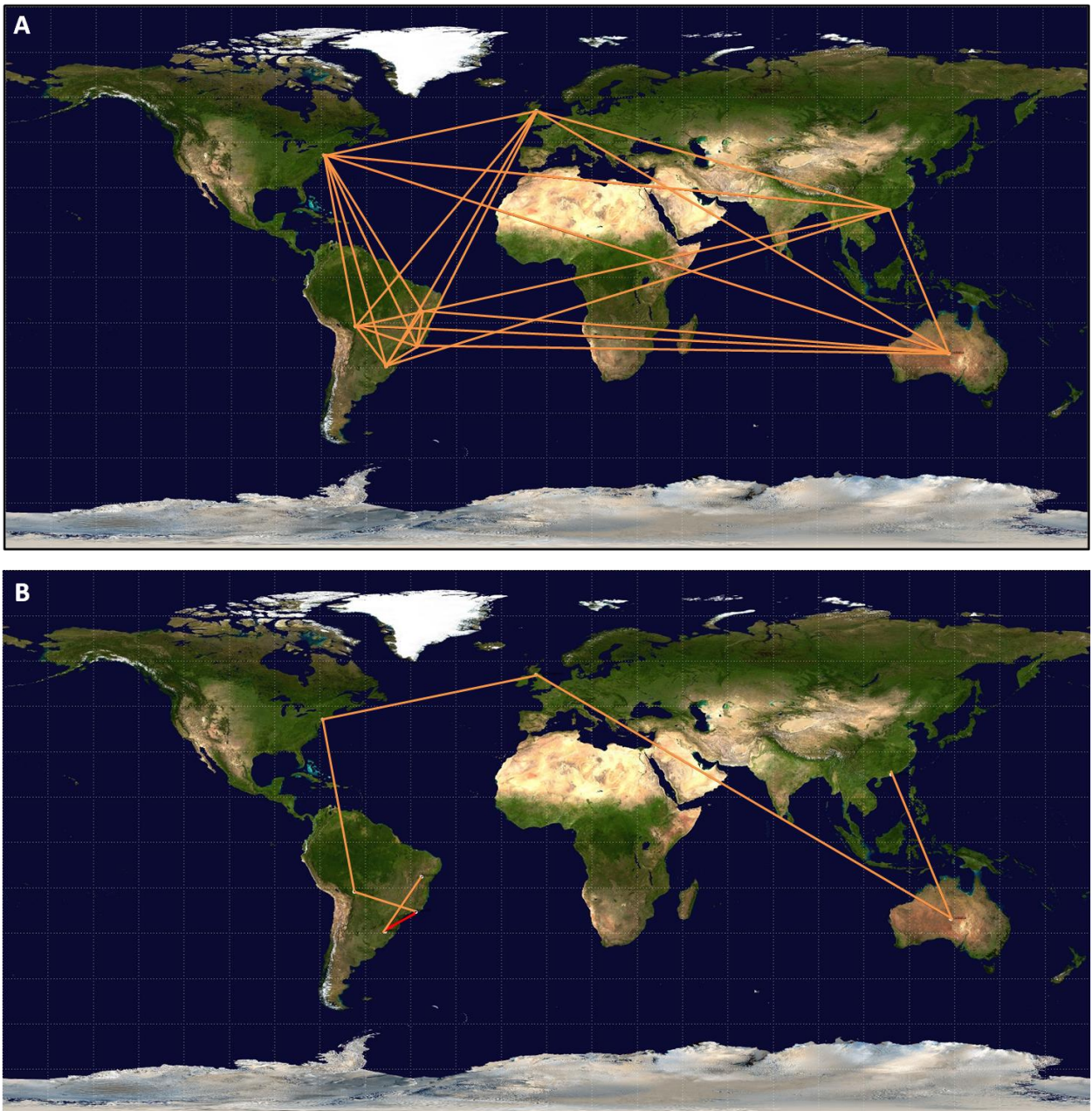


Figura 4.8: A análise de BSSVS foi usada para reduzir o número de parâmetros para aqueles com as taxas de transição significativamente diferentes de zero (A) e as relações de relações migração mais significativas (B) ($BF > 5$) entre as regiões geográficas avaliadas. Traço em vermelho, $BF > 1000$.

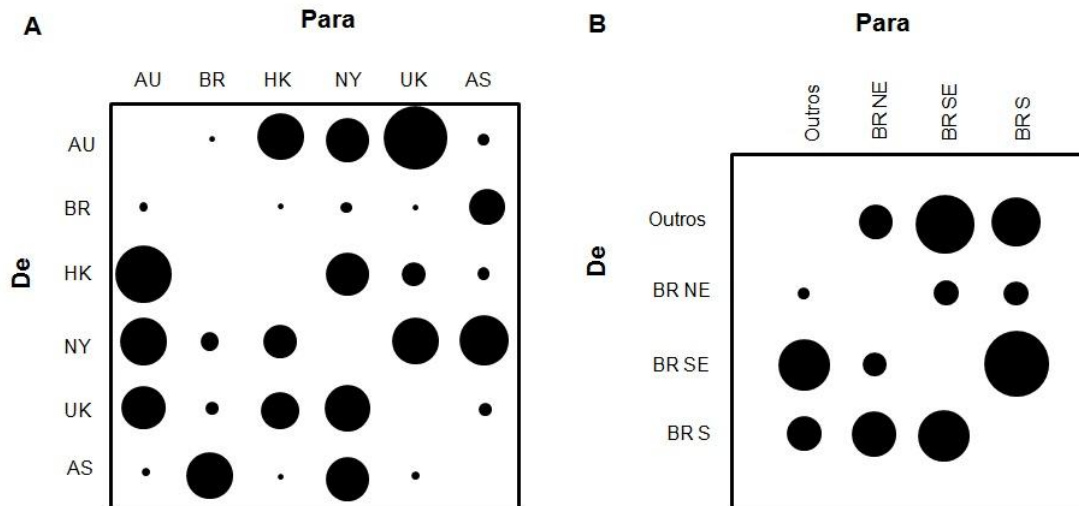


Figura 4.9: Fluxo viral entre as diferentes regiões geográficas do mundo (A) e do Brasil (B), estimado pela proporção de eventos migratórios observados a partir da árvore Bayesiana de MCC.

As taxas de migração do vírus influenza A(H3N2) entre as diferentes regiões geográficas com uma forte relação epidemiológica ($BF > 3$) foram também estimadas através da contagem do número médio de eventos migratórios em todas as árvores amostradas durante a corrida Bayesiana pelo método de “Markov-jumps”. As maiores taxas de migração viral foram entre NY/UK e AU/UK (>45), seguido por AU/HK, NY/AS e Sul/Sudeste (~ 30), e AS/Sudeste e Sul/Nordeste (<15) (Figura 4.10). Os fluxos de entrada e saída entre cada par de regiões foram muito próximos, condizente com um modelo de dispersão simétrico.

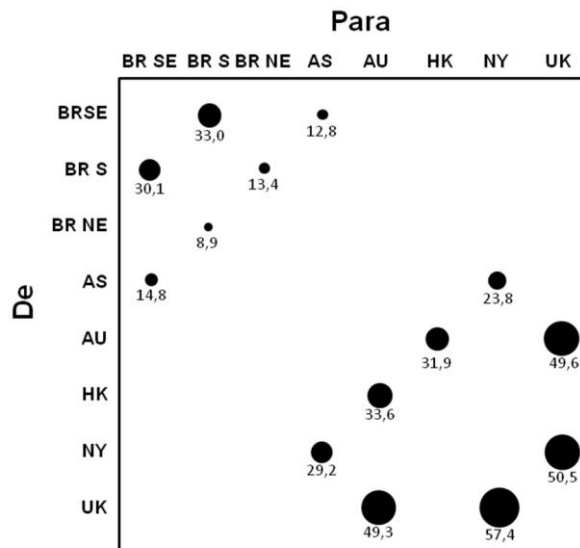


Figura 4.10: Fluxo viral entre as regiões geográficas do mundo e do Brasil com relação epidemiológica significativa, estimado pelo método de “Markov-jumps” a partir dos eventos migratórios observados no conjunto de árvores da corrida Bayesiana.

5. DISCUSSÃO

O vírus influenza A possui um padrão de sazonalidade anual que varia desde uma alta incidência sazonal no inverno em regiões temperadas até um comportamento mais endêmico nos trópicos (Nicholson et al., 1998, Grenfell et al., 2004). Com o aumento na disponibilidade de dados moleculares e epidemiológicos e o desenvolvimento de novas ferramentas de análise, tem sido possível estudar o modelo de evolução e migração do vírus influenza A numa escala regional e global. Estes estudos revelam a contínua introdução de novas cepas virais associadas com epidemias intensas nas regiões temperadas dos Hemisférios Sul e Norte, seguidas por gargalos sazonais de transmissão e ausência de persistência viral sustentada entre as epidemias (Nelson & Holmes, 2007, Rambaut et al., 2008, Bedford et al., 2010). Embora a sazonalidade e os padrões de difusão do vírus influenza nas áreas temperadas estejam razoavelmente bem caracterizados, a região dos trópicos segue ainda pouco explorada principalmente pela falta de sequências e informações disponíveis em domínios públicos (Viboud et al., 2006, Viboud et al., 2013).

Buscando entender melhor a dinâmica evolutiva do vírus influenza A(H3N2) dentro do Brasil, bem como o papel do País no cenário global de dispersão do vírus, desenvolvemos este estudo. Para isso, estudamos sequências da porção mais variável do vírus, a região HA1 do gene HA, de amostras do subtipo A(H3N2) coletadas no Brasil no período de 1999 a 2012. A análise filogenética mostrou um perfil temporal claro nas sequências brasileiras, com grupos bem definidos ao longo do tempo e uma contínua mudança de variantes virais. A taxa média de evolução estimada para o gene HA do vírus influenza A(H3N2) no Brasil foi de $5,1 \times 10^{-3}$ subst./sítio/ano, muito similar à taxa média descrita previamente para este vírus em outras regiões (Fitch et al., 1991, Fitch et al., 1997, Nelson et al., 2006, Rambaut et al., 2008, Bedford et al., 2010). A topologia da árvore, a rápida taxa de substituição do vírus e a acumulação de mutações não-sinônimas ao longo do tempo são características do modelo evolutivo de "drift" antigênico, segundo o qual os vírus influenza A estão continuamente sendo selecionados pela imunidade da população onde circulam, o que determina a rápida divergência do vírus e a contínua renovação das variantes virais (Ferguson et al., 2003, Grenfell et al., 2004, Nelson & Holmes, 2007).

Através das análises da topologia da árvore e das estimativas de distâncias genéticas e de aminoácidos em comparação com os protótipos vacinais, foi possível estimar a classificação antigênica para cada sequência brasileira analisada neste estudo, no sentido de associar cada um dos clados identificados na população brasileira a um protótipo vacinal. Foram identificadas seis linhagens antigênicas diferentes circulando nas distintas regiões brasileiras no período 1999-2012. Quando as variantes antigênicas de influeza circulantes na população coincidem com a

cepa vacinal, a imunização pode reduzir em até 90% o número de infecções (Palache, 1997). Nosso estudo indica que em metade dos anos avaliados (1999, 2003, 2004, 2006, 2011 e 2012) a cepa vacinal utilizada, para cada período, estava discordante das cepas virais majoritariamente circulantes no Brasil, sugerindo uma eficácia reduzida da vacinação durante esses anos. Para os anos de 2003, 2004, 2006, 2009, 2010 e 2011 foi possível verificar a cocirculação de duas cepas virais antigenicamente distintas, o que gera uma situação extrema, visto que apenas uma cepa pode ser contemplada na composição da vacina anti-influenza. O nosso estudo sugere ainda a existência de diferenças na frequência das diferentes variantes virais circulantes em distintas regiões em alguns anos. A persistência de múltiplas linhagens de A(H3N2) dentro de uma única população, como tem sido observado ultimamente, indica que as populações humanas representam um maior reservatório de vírus geneticamente distintos do que anteriormente se havia previsto (Holmes et al., 2005). Essa variedade na circulação de diferentes cepas antigênicas, observadas em alguns anos no Brasil, assim como o atraso para atualização das capas vacinais após a identificação de uma nova cepa e sua inclusão na composição da vacina anti-influenza, poderia ser sanado caso as "vacinas universais" anti-influenza fossem satisfatoriamente desenvolvidas e utilizadas na população. Estudos estão em fase inicial de desenvolvimento e apontam para a possibilidade do uso da região da haste da HA (HA2) como alternativa, uma vez que, alguns aminoácidos dessa região são bem conservados entre todos subtipos de influenza A e, o mais interessante, de influenza B (Oxford, 2013).

Vale ressaltar que a interpretação antigênica de dados genéticos inclui uma série de dificuldades, devido a variação no efeito antigênico associado às mutações na cadeia peptídica. Algumas poucas mutações podem conduzir a grandes alterações antigênicas, e cepas filogeneticamente próximas podem ser antigenicamente distintas. Esta dessincronização entre os dados genéticos e antigênicos está mais comumente relacionado a mutação entre aminoácidos com características bioquímicas opostas, à perda ou aparecimento de sítios de glicosilação, ao local dessa substituição, ou a interação de múltiplas substituições (Smith et al., 2004). Foi possível verificar aparente discrepância entre nossos resultados, uma vez que, durante as análises de comparação com sequências da Austrália acerca da escolha das cepas vacinais para o Hemisfério Sul, observamos maior distância genética para as sequências do Brasil nos anos de 1999, 2001, 2003 e 2006 (Figura 4.3). Entretanto, nossos dados de análise filogenética associados aos dados de inferência antigênica, apontam 1999, 2003, 2004, 2006, 2011 e 2012 como anos em que a vacina escolhida foi discordante dos vírus circulantes no Brasil, desse modo, observamos que, embora 2001 tenha apresentado uma distância genética acima de 0,017 para as sequências

brasileiras, não observamos diferenças antigênicas em relação a cepa vacinal, assim como, para os anos de 2004, 2011 e 2012, valores de distância genética relativamente baixos, não explicitam a alteração antigênica observada. Isso porque, a análise da distância genética não reflete as mudanças aminoacídicas necessárias para que haja mudança estrutural na HA, devido a substituições nos sítios antigênicos. Smith e colaboradores evidenciaram que apenas uma substituição de aminoácido pode ser suficiente para causar uma mudança antigênica responsável pela transição de clados (Smith et al., 2004).

De todas as transições de variantes antigênicas, a transição PA99-FU02, durante o período de 1999-2004, foi a que apresentou o maior número de mutações, ocorrendo tanto nos sítios antigênicos A, B e E como em regiões fora dos sítios. Estudos antigênicos combinados com análises filogenéticas determinaram que as mutações (H155T, Q156H) presentes no sítio B, foram as responsáveis pela diferenciação antigênica entre as variantes PA99 e FU02 (Jin et al., 2005). O nosso estudo indica que a variante FU02 provavelmente surgiu na Ásia ($PP = 0.60$) em 2001, estando de acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde que apontaram a origem desta cepa no Japão e na Coreia em 2002 (WHO, 2003) onde as primeiras cepas virais foram caracterizados antigenicamente. Esta variante foi identificada na Europa no final do período sazonal de 2002-2003 do Hemisfério Norte, porém somente durante a estação seguinte de 2003-2004 as cepas virais FU02-like foram predominantes (Paget et al., 2003), sendo que em 2003 já era predominante no Hemisfério Sul (Nova Zelândia e Austrália) (Barr et al., 2005). Nossos resultados indicam a circulação da variante FU02 no Brasil desde o ano de 2003. Entretanto, apenas em 2004 a cepa FU02 entraria na composição da vacina anti-influenza. A manutenção da cepa PA99 na composição da vacina durante 2000-2003 levou à ineficácia da mesma no biênio 2002-2003 (Jin et al., 2005).

Durante o período 2004-2009, o vírus influenza A(H3N2) não apresentou grandes saltos antigênicos, mas as cepas vacinais foram atualizadas ano a ano. Verificamos que a cepa WL04 e CA04, que compuseram as vacinas de 2005 e 2006, respectivamente, não apresentaram nenhuma mudança na região da HA1, e o mesmo observamos para WI05 e BI07, cepas vacinais de 2007 e 2008/2009, respectivamente, estando de acordo com os resultados de Popova e colaboradores (Popova et al., 2012). Porém, a transição WL04-BI07 representou uma mutação no sítio antigênico B (S193F) e outra no A (K140I), sendo que esta última foi descrita por Popova como determinante para a modificação antigênica da HA (Popova et al., 2012). Em 2009, ano em que surgiu e predominou o subtipo pandêmico A(H1N1)pdm09, as cepas virais circulantes de A(H3N2) no Brasil, embora não tenham se diferenciado antigenicamente da BI07, foram

agrupadas em um novo clado, como podemos observar nas análises filogenéticas. A mutação K173Q, localizada no sítio antigênico D, foi a assinatura característica desse novo ramo. Esta diversificação observada na topologia da árvore mostrou suporte estatístico robusto (aLRT = 0,89).

Para o período 2010-2012, dois grupos antigenicamente distintos foram observados, PE09 e VII1. Duas mutações localizadas no sítio B são comuns aos dois grupos, K158N e N189K, distinguindo-os de BI07. Como mutações exclusivas na HA, a cepa vacinal PE09 ainda possui alterações nos sítios A (N144K) e E (E62K). Já a cepa VII1 apresenta uma mutação exclusiva no sítio D (T212A) quando comparada com BI07. Dentro do grupo VII1 identificamos um clado com suporte alto (aLRT > 0,90) associado a mutações nos sítios C (D53N), E (Y94H) e D (I230V), porém esse grupo ainda é antigenicamente relacionado a VII1. Tais resultados corroboram o fato de que, por mais que existam mutações nos sítios C, D e E, para que ocorra uma mudança antigênica importante, devem ser alterados resíduos no sítio imunodominante B (Ohshima et al., 2011). Estruturalmente esses sítios estão localizados na parte superior da cabeça globular da molécula de HA e acredita-se que cada uma destas regiões constitui um local de ligação de anticorpo contra o qual os anticorpos neutralizantes são produzidos durante a infecção por vírus (Lin et al., 2013). Embora a variante VII1 tenha provavelmente se originado em 2008 e esteja circulando amplamente em diferentes regiões brasileiras desde 2010, apenas em 2013 a cepa VII1 entrou na composição da vacina no Brasil, indicando uma demora acentuada na decisão sobre a atualização do protótipo vacinal.

Com intuito de verificar uma potencial relação entre o grau de ajuste da vacina de influenza A(H3N2) com as cepas virais circulantes e o nível de circulação deste subtipo viral, verificamos o número de amostras positivas de influenza A(H3N2) durante o período de 1999 a 2012 no Brasil a partir das informações obtidas no banco de dados do FluNet/OMS (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/). Observamos que para os anos em que houve desajuste entre a vacina e as cepas virais circulantes (2003-2004, 2006, 2010-2012), foi observada uma maior detecção do subtipo A(H3N2) (APÊNDICE F), sugerindo uma possível redução da eficácia da vacina nesses anos. Para o ano de 1999, os dados do FluNet/OMS indicam a circulação do vírus influenza A, sem a informação do subtipo circulante para o período epidêmico. Além disso, observa-se em 2010 um aumento na circulação do subtipo A(H3N2) a partir da 45ª semana epidemiológica, embora a vacina tenha sido acertada em relação ao início da circulação das variantes PE09-like no Brasil, vale ressaltar que houve cocirculação com a

variante VII1, não contemplada na vacina, podendo indicar esse aumento na detecção do subtipo A(H3N2) na população.

A reconstrução da escala temporal dos eventos evolutivos permitiu verificar que o tMRCA de cada nova linhagem antigênica é 1-2 anos mais recente que a sua detecção na população humana e 2-3 anos mais recente que a sua detecção no Brasil. A única exceção foi a linhagem VII1, detectada no Brasil em 2009, apenas um ano após sua provável data de origem. No entanto, apenas uma sequência brasileira foi identificada como VII1-*like* no ano de 2009 (A/PR/160/2009), na qual identificamos como um caso importado, uma vez que o indivíduo esteve na Nigéria no dia 06/maio/2009 e apresentou os primeiros sintomas em 7/maio, tendo coletado o material no Paraná no dia 09/maio. Portanto, podemos concluir que a linhagem VII1 somente começou a circular no Brasil de fato no ano de 2010. O atraso na detecção e circulação da maioria das linhagens de influenza A(H3N2) no Brasil foi acompanhado por um atraso similar em outros países da América do Sul, com exceção da Colômbia que apresentou duas sequências da variante PE09 já em 2009. Isto sugere que a América do Sul teria um papel secundário na origem e disseminação de novas variantes virais e que a maioria das linhagens de influenza A(H3N2) pode ser detectada na população humana alguns meses antes de serem importadas para a América do Sul. Desta forma, pode ser mais fácil antecipar as mudanças antigênicas das populações virais e ajustar as cepas vacinais a serem usadas na América do Sul quando comparada a outras regiões do globo. Sendo válida esta hipótese, clados selecionados e identificadas na América do Norte por exemplo, deveriam ser consideradas como potenciais novos ramos nas árvores filogenéticas no Brasil, observando-se a janela de oportunidade da estação seguinte de influenza.

Análises filogeográficas são uma abordagem comum em ecologia molecular, ligando processos históricos na evolução de genes amostrados em populações com diferentes distribuições espaciais (Knowles & Maddison, 2002). A análise filogenética do gene HA dos vírus influenza A(H3N2) isolados no Brasil, América do Sul, Nova Iorque, Reino Unido, Hong Kong e Austrália mostrou uma frequente mistura de sequências virais do mesmo ano e de distintas regiões. Uma análise estatística de estruturação geográfica das sequências na árvore filogenética, no entanto, rejeitou a hipótese de *panmixis*, indicando que a distribuição filogenética do vírus influenza A(H3N2) em uma escala global não é completamente aleatória. Níveis significativos de estruturação geográfica foram observados particularmente para as diferentes regiões do Brasil, América do Sul, Austrália, e Hong Kong.

Dois modelos alternativos têm sido propostos para explicar a dinâmica de disseminação global dos vírus influenza A(H3N2). O modelo mais simples propõe que a diversidade genética global do subtipo A(H3N2) é resultado de um fluxo contínuo e unidirecional de novas linhagens genéticas e antigênicas selecionadas dentro das áreas tropicais do sudeste da Ásia para regiões temperadas dos Hemisférios Norte e Sul (Rambaut et al., 2008). Outro modelo mais complexo propõe que nenhuma região geográfica seria capaz de atuar sozinha como fonte de variabilidade viral e as epidemias sazonais nas regiões temperadas seriam disseminadas a partir de distintas regiões geográficas, inclusive a partir de outras regiões temperadas, ao tempo que a manutenção dos vírus nas regiões tropicais dependeria da introdução constante de amostras circulantes nos períodos epidêmicos nas regiões temperadas (Bahl et al., 2011). A reconstrução da posição geográfica das sequências no tronco da árvore filogenética apresentada neste trabalho mostra que várias localidades podem ter agido como fonte de novas variantes antigênicas de influenza A(H3N2) condizente com o modelo de Bahl e colaboradores (2011), embora com diferentes probabilidades. Hong Kong e Brasil representam, respectivamente, os locais com maior e menor probabilidade de origem das novas variantes disseminadas em escala global, enquanto as outras regiões apresentam uma probabilidade acumulada intermediária.

De acordo com Bedford e colaboradores, regiões menos conectadas serão menos propensas a espalhar variantes do que regiões altamente conectadas (Bedford et al., 2010). A estimativa de fluxo gênico obtida no nosso estudo a partir da árvore de MCC foi compatível com este modelo. Esta estimativa nos permitiu verificar que os maiores fluxos gênicos ocorreram entre Austrália, Hong Kong, Nova Iorque e Reino Unido, enquanto que regiões menos conectadas com o Brasil e outros países da América do Sul têm um fluxo gênico muito mais restrito. Observamos que a maioria dos eventos migratórios de entrada na América do Sul parece ocorrer preferencialmente a partir da América do Norte, aqui representada por Nova Iorque. Isso está de acordo com os achados de Bedford e colaboradores, que observa em suas análises que a maioria das cepas virais que chegam à América do Sul é oriunda dos Estados Unidos (Bedford et al., 2010). Estes resultados são também consistentes com o estudo de Russell e colaboradores que demonstra a existência de uma rede hierárquica de disseminação, onde a América do Sul está fortemente conectada por viagens para Europa e América do Norte, mas não com Ásia ou Oceania (Russell et al., 2008). Sendo assim, as cepas são primeiramente disseminadas para Europa e América do Norte e, então, desses locais para América do Sul, sugerindo ainda que a vacina na América do Sul deveria ser preferencialmente desenvolvida e atualizada com cepas oriundas dos Estados Unidos de estações sazonais anteriores (Russell et al., 2008).

De acordo com dados epidemiológicos, a sazonalidade do vírus influenza no Brasil parece começar nas regiões equatoriais pouco povoadas do Norte e viajar ao longo de um período de três meses até atingir as áreas com clima mais temperado do Sul durante o inverno (Alonso et al., 2007). Este modelo é suportado pela ideia de que os trópicos servem como fonte das variantes virais que iniciam os surtos sazonais de influenza A(H3N2) nas regiões temperadas. Além do clima, a menor distância geográfica com o Hemisfério Norte poderia também definir a região Norte do País como o principal local de reintrodução anual do vírus influenza dentro do Brasil (Alonso et al., 2007). Nosso estudo, no entanto, sugere que a maioria das cepas de influenza A(H3N2) que chegam ao Brasil é oriunda da América do Sul e que a principal porta de entrada das mesmas seria a região Sudeste do Brasil. O intenso tráfego aéreo existente entre as grandes cidades da região Sudeste, além dos países vizinhos com outras regiões do Brasil, poderia explicar os nossos resultados, uma vez que o transporte aéreo internacional possui um importante papel na dispersão do vírus influenza (Cooper et al., 2006). Podemos propor ainda um terceiro modelo com duas portas principais de entrada e disseminação (regiões Sudeste e Norte) de novas variantes de influenza no Brasil. Para discriminar entre estes modelos alternativos, se faz necessário incluir um maior número de sequências das regiões Norte e Nordeste nas reconstruções filogeográficas.

Nossos achados ainda demonstram que dentro do Brasil, o maior fluxo parece acontecer da região Sudeste para o Sul, e do Sul para o Nordeste. Verificamos também que a identificação de novas linhagens virais no Nordeste apresenta um atraso em relação ao Sul e ao Sudeste, embora exista um viés em relação ao quantitativo de sequências do Nordeste incluído no nosso estudo. Estes dados sugerem que a cepa circulante no inverno das regiões Sul e Sudeste de determinado ano epidêmico, possivelmente, será a cepa que circulará no início do próximo ano epidêmico na região Nordeste. Moura e colaboradores (2009) associaram a incidência, embora baixa (5,5%), de casos de influenza no período de julho-setembro em Fortaleza ao aumento do fluxo de turistas das regiões Sul e Sudeste do País, que viajam para o Nordeste buscando fugir das baixas temperaturas durante esses meses em suas cidades de origem. Como o período de maior incidência de influenza nestas regiões vai de maio a setembro (com pico de junho a agosto), alguns turistas podem sair de suas cidades já gripados ou em período de incubação, representando potenciais transmissores de influenza para pessoas suscetíveis em Fortaleza (Moura et al., 2009). Outros estudos realizados no Nordeste também apontam picos epidêmicos no segundo semestre do ano. Em Maceió, no ano de 2001, foi possível verificar picos em julho,

setembro, outubro e dezembro (Oliveira et al., 2004); enquanto Salvador apresentou surtos de setembro a novembro no ano de 1998 (Moura et al., 2003).

Análises integradas dos modelos epidemiológicos e evolutivos para a transmissão do vírus influenza A(H3N2) podem beneficiar a saúde pública e ajudar a orientar em estratégias de intervenção para planos de prevenção de pandemias e, ainda, o esclarecimento sobre os padrões de migração e origem das populações dos vírus influenza pode levar ao aprimoramento no desenvolvimento das vacinas e melhorar os sistemas de vigilância. Nossos achados mostram a variabilidade genética do influenza A(H3N2) durante todo o período de vacinação nacional para o vírus influenza no Brasil, contribuindo para compreensão da dinâmica de dispersão dos vírus influenza dentro do País e no cenário global.

6. CONCLUSÕES

- No período de 1999 a 2012, circularam seis linhagens antigênicas de vírus influenza A(H3N2) na população brasileira.
- Foi possível verificar a cocirculação de duas linhagens de influenza A(H3N2) para os anos de 2003, 2004, 2006, e 2009-2011 no Brasil, assim como a existência de diferenças na frequência das linhagens virais entre as regiões Sul, Sudeste e Nordeste em alguns anos.
- Em metade dos anos avaliados (1999, 2003, 2004, 2006, 2011 e 2012) as linhagens virais majoritariamente circulantes no Brasil não estavam de acordo com a cepa vacinal utilizada, sugerindo uma eficácia reduzida da vacina durante esses anos.
- Verificamos que o Brasil possui um papel marginal na origem e disseminação global de novas linhagens de influenza A(H3N2), aparecendo no final da rede de eventos migratórios.
- A circulação de uma nova linhagem de influenza A(H3N2) no Brasil acontece 1-2 depois de sua detecção na população humana, e 2-3 anos depois em relação à data da origem estimada para cada variante.
- As linhagens de influenza A(H3N2) chegam ao Brasil fundamentalmente desde os países vizinhos da América do Sul e penetram no País principalmente através da região Sudeste, apontando a importância da vigilância epidemiológica desta região para a detecção precoce da introdução de novas linhagens virais no Brasil.

- Foi detectado um fluxo migratório viral significativo entre as regiões Sul/Sudeste e Sul/Nordeste do Brasil, e um fluxo menor entre as regiões Sudeste/Nordeste.
- Não foram observadas diferenças significativas na dinâmica evolutiva do vírus influenza A(H3N2) nas regiões temperadas (Sul) e tropicais (Sudeste e Nordeste) do Brasil.
- O papel secundário do Brasil na origem de novas variantes de influenza A(H3N2) e sua posição mais periférica na cadeia de disseminação do vírus a escala global, oferecem uma janela de tempo importante para antecipar as mudanças antigênicas das populações virais e reformular as cepas vacinais, no sentido de maximizar a eficiência das vacinas a serem usadas no País.

7. PERSPECTIVAS

Questões sobre a distribuição geográfica e temporal das cepas de vírus influenza A(H3N2) em diferentes regiões do Brasil, o fluxo de importação e exportação do vírus entre o Brasil e outras regiões do mundo, e ainda, a associação destas amostras com as recomendações para a vacina anti-influenza foram abordadas de modo pioneiro neste trabalho. Entretanto, nem todas as questões puderam ser avaliadas com a mesma profundidade e algumas perguntas continuam em aberto e servem como perspectivas de continuação para este trabalho:

- Obter estimativas de fluxo de disseminação viral dentro do Brasil mais precisas, agregando à análise sequências das regiões Centro-Oeste, Norte e mais sequências do Nordeste;
- Verificar com base em análises estatísticas os dados genéticos e epidemiológicos disponíveis no país, a fim de apoiar a escolha da vacina anti-influenza para o Hemisfério Sul;
- Inferir quais fatores (tráfego aéreo, tráfego terrestre, tamanho populacional, etc) tem maior influência no fenômeno da disseminação do vírus influenza no Brasil;
- Realizar uma avaliação similar com os outros vírus influenza circulantes na população, a saber: influenza A(H1N1)pdm09 e influenza B, complementando o trabalho iniciado neste estudo.

8. REFERÊNCIAS

- Abascal, F., Zardoya, R. & Posada, D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105.
- Alonso, W. J., Viboud, C., Simonsen, L., Hirano, E. W., Daufenbach, L. Z. & Miller, M. A. 2007. Seasonality of Influenza in Brazil: A Traveling Wave from the Amazon to the Subtropics. *American Journal of Epidemiology* **165**: 1434-1442.
- Anisimova, M. & Gascuel, O. 2006. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Systematic Biology* **55**: 539-552.
- Ann, J., Papenburg, J., Bouhy, X., Rhéaume, C., Hamelin, M.-È. & Boivin, G. 2012. Molecular and antigenic evolution of human influenza A/H3N2 viruses in Quebec, Canada, 2009–2011. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **53**: 88-92.
- Bahl, J., Nelson, M. I., Chan, K. H., Chen, R., Vijaykrishna, D., Halpin, R. A., Stockwell, T. B., Lin, X., Wentworth, D. E., Ghedin, E., Guan, Y., Peiris, J. S. M., Riley, S., Rambaut, A., Holmes, E. C. & Smith, G. J. D. 2011. Temporally structured metapopulation dynamics and persistence of influenza A H3N2 virus in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 19359-19364.
- Bao, Y., Bolotov, P., Dernovoy, D., Kiryutin, B., Zaslavsky, L., Tatusova, T., Ostell, J. & Lipman, D. 2008. The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information. *Journal of Virology* **82**: 596-601.
- Barr, I. G., Komadina, N., Hurt, A., Shaw, R., Durrant, C., Iannello, P., Tomasov, C., Sjogren, H. & Hampson, A. W. 2003. Reassortants in recent human influenza A and B isolates from South East Asia and Oceania. *Virus Research* **98**: 35-44.
- Barr, I. G., Komadina, N., Hurt, A. C., Iannello, P., Tomasov, C., Shaw, R., Durrant, C., Sjogren, H. & Hampson, A. W. 2005. An influenza A(H3) reassortant was epidemic in Australia and New Zealand in 2003. *Journal of Medical Virology* **76**: 391-397.
- Bedford, T., Cobey, S., Beerli, P. & Pascual, M. 2010. Global migration dynamics underlie evolution and persistence of human influenza A (H3N2). *PLoS Pathog* **6**: e1000918.
- Belshe, R. B. 2009. Implications of the Emergence of a Novel H1 Influenza Virus. *New England Journal of Medicine* **360**: 2667-2668.

- Bergmann, M. & Muster, T. 1996. Mutations in the nonconserved noncoding sequences of the influenza A virus segments affect viral vRNA formation. *Virus Research* **44**: 23-31.
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A. & Lemey, P. 2011. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* **27**: 2910-2912.
- Cooper, B. S., Pitman, R. J., Edmunds, W. J. & Gay, N. J. 2006. Delaying the International Spread of Pandemic Influenza. *PLoS Med* **3**: e212.
- Cox, N. J. & Subbarao, K. 1999. Influenza. *The Lancet* **354**: 1277-1282.
- Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., Gubareva, L. V., Xu, X., Bridges, C. B. & Uyeki, T. M. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* **360**: 2605-15.
- De Clercq, E. 2006. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 1015-1025.
- Deem, M. W. & Pan, K. 2009. The epitope regions of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy. *Protein Engineering Design and Selection* **22**: 543-546.
- Drummond, A. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. pp. BioMed Central.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J. & Rambaut, A. 2006. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol* **4**: e88.
- Drummond, A. J., Nicholls, G. K., Rodrigo, A. G. & Solomon, W. 2002. Estimating Mutation Parameters, Population History and Genealogy Simultaneously From Temporally Spaced Sequence Data. *Genetics* **161**: 1307-1320.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O. G. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1185-1192.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1969-1973.
- Fauquet, C. M. & Fargette, D. 2005. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* **2**: 64.
- Ferguson, N. M., Galvani, A. P. & Bush, R. M. 2003. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* **422**: 428-433.
- Fitch, W. M., Bush, R. M., Bender, C. A. & Cox, N. J. 1997. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 7712-7718.

- Fitch, W. M., Leiter, J. M., Li, X. Q. & Palese, P. 1991. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 4270-4274.
- Galiano, M., Johnson, B. F., Myers, R., Ellis, J., Daniels, R. & Zambon, M. 2012. Fatal Cases of Influenza A(H3N2) in Children: Insights from Whole Genome Sequence Analysis. *PLoS ONE* **7**: e33166.
- Ghedin, E., Sengamalay, N. A., Shumway, M., Zaborsky, J., Feldblyum, T., Subbu, V., Spiro, D. J., Sitz, J., Koo, H., Bolotov, P., Dernovoy, D., Tatusova, T., Bao, Y., St George, K., Taylor, J., Lipman, D. J., Fraser, C. M., Taubenberger, J. K. & Salzberg, S. L. 2005. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* **437**: 1162-1166.
- Grenfell, B. T., Pybus, O. G., Gog, J. R., Wood, J. L. N., Daly, J. M., Mumford, J. A. & Holmes, E. C. 2004. Unifying the Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Pathogens. *Science* **303**: 327-332.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P. & Gascuel, O. 2005. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* **33**: W557-W559.
- Gupta, V., Earl, D. J. & Deem, M. W. 2006. Quantifying influenza vaccine efficacy and antigenic distance. *Vaccine* **24**: 3881-3888.
- Hay, A. J. (1998) The Virus Genome and its Replication. In: *Textbook of Influenza*, (Nicholson, K. G., Webster, R. G. & Hay, A. J., eds.). pp. 43-53. Blackwell Science.
- Hilleman, M. R. 2002. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* **20**: 3068-3087.
- Holmes, E. C., Ghedin, E., Miller, N., Taylor, J., Bao, Y., St George, K., Grenfell, B. T., Salzberg, S. L., Fraser, C. M., Lipman, D. J. & Taubenberger, J. K. 2005. Whole-Genome Analysis of Human Influenza A Virus Reveals Multiple Persistent Lineages and Reassortment among Recent H3N2 Viruses. *PLoS Biol* **3**: e300.
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L. & Li, W. 2010. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* **26**: 680-682.
- Jin, H., Zhou, H., Liu, H., Chan, W., Adhikary, L., Mahmood, K., Lee, M.-S. & Kemble, G. 2005. Two residues in the hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like influenza viruses are responsible for antigenic drift from A/Panama/2007/99. *Virology* **336**: 113-119.

- Kang, S. M., Song, J. M. & Compans, R. W. 2011. Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Research* **162**: 31-38.
- Knowles, L. L. & Maddison, W. P. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* **11**: 2623-2635.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. & Suchard, M. A. 2009. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLoS Comput Biol* **5**: e1000520.
- Lin, J.-H., Chiu, S.-C., Lin, Y.-C., Cheng, J.-C., Wu, H.-S., Salemi, M. & Liu, H.-F. 2013. Exploring the Molecular Epidemiology and Evolutionary Dynamics of Influenza A Virus in Taiwan. *PLoS ONE* **8**: e61957.
- Lindstrom, S., Garten, R., Balish, A., Shu, B., Emery, S., Berman, L., Barnes, N., Sleeman, K., Gubareva, L., Villanueva, J. & Klimov, A. 2012. Human infections with novel reassortant influenza A(H3N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg Infect Dis*.
- Liu, D., Shi, W., Shi, Y., Wang, D., Xiao, H., Li, W., Bi, Y., Wu, Y., Li, X., Yan, J., Liu, W., Zhao, G., Yang, W., Wang, Y., Ma, J., Shu, Y., Lei, F. & Gao, G. F. 2013. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses. *The Lancet* **381**: 1926-1932.
- Lofgren, E., Fefferman, N. H., Naumov, Y. N., Gorski, J. & Naumova, E. N. 2007. Influenza Seasonality: Underlying Causes and Modeling Theories. *Journal of Virology* **81**: 5429-5436.
- Lowen, A. C. & Palese, P. 2007. Influenza Virus Transmission: Basic Science and Implications for the Use of Antiviral Drugs During a Pandemic. *Infectious Disorders - Drug Targets* **7**: 318-328.
- McHardy, A. C. & Adams, B. 2009. The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* **5**: e1000566.
- Mello, W. A. d., Paiva, T. M. d., Ishida, M. A., Benega, M. A., Santos, M. C. d., Viboud, C., Miller, M. A. & Alonso, W. J. 2009. The Dilemma of Influenza Vaccine Recommendations when Applied to the Tropics: The Brazilian Case Examined Under Alternative Scenarios. *PLoS ONE* **4**: e5095.
- Miller, M. S., Tsibane, T., Krammer, F., Hai, R., Rahmat, S., Basler, C. F. & Palese, P. 2013. 1976 and 2009 H1N1 Influenza Virus Vaccines Boost Anti-Hemagglutinin Stalk Antibodies in Humans. *Journal of Infectious Diseases* **207**: 98-105.
- Minin, V. & Suchard, M. 2008a. Counting labeled transitions in continuous-time Markov models of evolution. *Journal of Mathematical Biology* **56**: 391-412.

- Minin, V. N. & Suchard, M. A. 2008b. Fast, accurate and simulation-free stochastic mapping. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**: 3985-3995.
- Motta, F. C., Rosado, A. S. & Siqueira, M. M. a. 2006a. Comparison between denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic analysis for characterization of A/H3N2 influenza samples detected during the 1999-2004 epidemics in Brazil. *Journal of Virological Methods* **135**: 76-82.
- Motta, F. C., Siqueira, M. M., Lugon, A. K., Straliootto, S. M., Fernandes, S. B. & Krawczuk, M. M. 2006b. The reappearance of Victoria lineage influenza B virus in Brazil, antigenic and molecular analysis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **36**: 208-214.
- Moura, F. E. A., Borges, L. C., Souza, L. S. d. F., Ribeiro, D. H., Siqueira, M. M. & Ramos, E. A. G. 2003. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **39**: 275-282.
- Moura, F. E. A., Perdigão, A. C. B. & Siqueira, M. M. 2009. Seasonality of Influenza in the Tropics: A Distinct Pattern in Northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **81**: 180-183.
- Muñoz, E. T. & Deem, M. W. 2005. Epitope analysis for influenza vaccine design. *Vaccine* **23**: 1144-1148.
- Nayak, D. P., Hui, E. K.-W. & Barman, S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research* **106**: 147-165.
- Nelson, M. I. & Holmes, E. C. 2007. The evolution of epidemic influenza. *Nature Reviews Genetics*: 196-205.
- Nelson, M. I., Simonsen, L., Viboud, C., Miller, M. A., Taylor, J., George, K. S., Griesemer, S. B., Ghedin, E., Sengamalay, N. A., Spiro, D. J., Volkov, I., Grenfell, B. T., Lipman, D. J., Taubenberger, J. K. & Holmes, E. C. 2006. Stochastic Processes Are Key Determinants of Short-Term Evolution in Influenza A Virus. *PLoS Pathog* **2**: e125.
- Nicholson, K. G., Webster, R. G. & Hay, A. J. 1998. *Textbook of Influenza*. Blackwell Science.
- Ohshima, N., Iba, Y., Kubota-Koketsu, R., Asano, Y., Okuno, Y. & Kurosawa, Y. 2011. Naturally Occurring Antibodies in Humans Can Neutralize a Variety of Influenza Virus Strains, Including H3, H1, H2, and H5. *Journal of Virology* **85**: 11048-11057.
- Oliveira, J. F. d., Sá, J. P. O. d. & Cruz, M. E. d. M. 2004. Identificação e monitorização do vírus Influenza A e B, na população de Maceió. *Ciência & Saúde Coletiva* **9**: 241-246.

- Oxford, J. S. 2013. Towards a universal influenza vaccine: volunteer virus challenge studies in quarantine to speed the development and subsequent licensing. *British Journal of Clinical Pharmacology* **76**: 210-216.
- Paget, W., Meerhoff, T. & Andrade, H. R. d. 2003. Heterogeneous influenza activity across Europe during the winter of 2002-2003. *Euro Surveillance* **8**: 437.
- Palache, A. 1997. Influenza Vaccines. A reappraisal of their use. *Drugs* **54**: 841-856.
- Palese, P. & Shaw, M. L. (2007) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields' Virology*, Vol. 2 (Knipe, D. M. & Howley, P. M., eds.). pp. 1647-1690. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Parker, J., Rambaut, A. & Pybus, O. G. 2008. Correlating viral phenotypes with phylogeny: Accounting for phylogenetic uncertainty. *Infection, Genetics and Evolution* **8**: 239-246.
- Popova, L., Smith, K., West, A. H., Wilson, P. C., James, J. A., Thompson, L. F. & Air, G. M. 2012. Immunodominance of Antigenic Site B over Site A of Hemagglutinin of Recent H3N2 Influenza Viruses. *PLoS ONE* **7**: e41895.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.
- Rambaut, A., Pybus, O. G., Nelson, M. I., Viboud, C., Taubenberger, J. K. & Holmes, E. C. 2008. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* **453**: 615-619.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Ruigrok, R. W. H. (1998) Structure of Influenza A, B and C Viruses. In: *Textbook of Influenza*, (Nicholson, K. G., Webster, R. G. & Hay, A. J., eds.). pp. 29-42. Blackwell Science.
- Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Garten, R. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, A. S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D. M. E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A. M. & Smith, D. J. 2008. The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses. *Science* **320**: 340-346.
- Siqueira, M. M., Aguiar, M. d. L., Motta, F. C. & Barreto, P. F. (2013) Influenza. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Vol. 2 (Coura, J. R., ed.). pp. 1855-1872 Doenças produzidas por vírus. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- Skehel, J. 2009. An overview of influenza haemagglutinin and neuraminidase. *Biologicals* **37**: 177-178.
- Smith, D. J., Lapedes, A. S., de Jong, J. C., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. 2004. Mapping the Antigenic and Genetic Evolution of Influenza Virus. *Science* **305**: 371-376.
- Sriwilaijaroen, N. & Suzuki, Y. 2012. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **88**: 226-249.
- Steinhauer, D. A. & Wharton, S. A. (1998) Structure and Function of the Haemagglutinin. In: *Textbook of Influenza*, (Nicholson, K. G., Webster, R. G. & Hay, A. J., eds.). pp. 54-64. Blackwell Science.
- Straliotto, S. M., Siqueira, M. M., Muller, R. L., Fischer, G. B., Cunha, M. L. T. & Nestor, S. M. 2002. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **35**: 283-291.
- Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of Influenza: Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28**: 399-408.
- Suzuki, Y. & Nei, M. 2002. Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 501-509.
- SVS (2009) Influenza. In: *Guia de Vigilância Epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica*. pp. 816 Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Brasília/DF.
- Tamerius, J., Nelson, M. I., Zhou, S. Z., Viboud, C., Miller, M. A. & Alonso, W. J. 2011. Global Influenza Seasonality: Reconciling Patterns across Temperate and Tropical Regions. *Environmental Health Perspectives*. **119**: 439-445.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.
- Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 2006. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Rev Biomed* **17**: 69-79.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.

- Tong, S., Li, Y., Rivaille, P., Conrardy, C., Castillo, D. A. A., Chen, L.-M., Recuenco, S., Ellison, J. A., Davis, C. T., York, I. A., Turmelle, A. S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M. R., Tang, K., Rowe, L. A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K. A., Cox, N. J., Anderson, L. J., Rupprecht, C. E. & Donis, R. O. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Viboud, C., Alonso, W. J. & Simonsen, L. 2006. Influenza in Tropical Regions. *PLoS Med* **3**: e89.
- Viboud, C., Nelson, M. I., Tan, Y. & Holmes, E. C. 2013. Contrasting the epidemiological and evolutionary dynamics of influenza spatial transmission. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**.
- von Itzstein, M. 2007. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 967-974.
- Webster, R. G. & Bean-Jr, W. J. (1998) Evolution and Ecology of Influenza Viruses: Interspecies Transmission. In: *Textbook of Influenza*, (Nicholson, K. G., Webster, R. G. & Hay, A. J., eds.). pp. 109-119. Blackwell Science.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* **56**: 152-179.
- Whittaker, g., Bui, M. & Helenius, A. 1996. The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends in Cell Biology* **6**: 67-71.
- WHO, W. H. O. 2003. Influenza. *Weekly epidemiological record* **78**: 393-396.
- WHO, W. H. O. 2009. Influenza (Seasonal). *Fact sheet* **211**.
- WHO, W. H. O. 2011. WHO global influenza surveillance network: manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
- WHO, W. H. O. 2012. Vaccines against influenza - WHO position paper. *Weekly epidemiological record* **87**: 461-476.
- Wiley, D. C. & Skehel, J. J. 1987. The Structure and Function of the Hemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus. *Annual Review of Biochemistry* **56**: 365-394.
- Wright, P. F., Neumann, G. & Kawaoka, Y. (2007) Orthomyxoviruses. In: *Fields' Virology*, Vol. 2 (Knipe, D. M. & Howley, P. M., eds.). pp. 1691-1730. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Yewdell, J. W., Caton, A. J. & Gerhard, W. 1986. Selection of influenza A virus adsorptive mutants by growth in the presence of a mixture of monoclonal antihemagglutinin antibodies. *Journal of Virology* **57**: 623-628.

9. APÊNDICES

9.7. APÊNDICE A - Lista de sequências do Brasil utilizadas nesse trabalho oriundas dos bancos de sequências de influenza, do banco de dados do LVRS e das amostras sequenciadas para esse estudo

Sequências disponíveis em bancos de dados públicos	Sequências do banco de dados do LVRS	Sequências exclusivas para esse estudo	
HM628693	A/AC/15093/2010	A/BA/12/2007	A/AL/383/2009
HM628694	A/AC/26954/2010	A/BA/366/2005	A/AL/4881/2009
CY099978	A/BA/100/2011	A/BA/45/2007	A/AL/5204/2009
CY099979	A/BA/44/2011	A/BA/50/2007	A/BA/11228/2009
CY099980	A/BA/45/2011	A/BA/53/2007	A/BA/1213/2012
CY099981	A/BA/65/2011	A/BA/58/2007	A/BA/204/2009
CY099982	A/BA/97/2011	A/BA/65/2007	A/BA/3551/2009
CY099983	A/BA/98/2011	A/BA/70/2007	A/BA/474/2009
EU514644	A/CE/177/2002	A/CE/59/2006	A/BA/484/2010
JN872405	A/DF/2010	A/CE/60/2005	A/BA/547/2010
JN872406	A/DF/2010	A/CE/63/2005	A/BA/569/2010
JN872407	A/DF/2010	A/CE/64/2005	A/BA/650/2010
JN872408	A/DF/2010	A/CE/66/2005	A/BA/690/2010
JN872409	A/DF/2010	A/CE/74/2005	A/BA/855/2010
JN872427	A/DF/2011	A/CE/75/2005	A/ES/450/2012
AY968024	A/ES/128/2000	A/CE/76/2005	A/MG/1116/2011
AY968018	A/ES/14/1999	A/CE/83/2005	A/MG/41/2012
AY968017	A/ES/3/1999	A/ES/294/2006	A/MG/42/2012
AY968021	A/ES/33/1999	A/ES/353/2005	A/MG/599/2011
AY968028	A/ES/454/2001	A/MG/105/2007	A/PR/1192/2012
AY968041	A/ES/88/2002	A/MG/109/2007	A/PR/1354/2011
JN872412	A/GO/2010	A/MG/202/2007	A/PR/1358/2011
JN872414	A/GO/2011	A/MG/204/2007	A/PR/1598/2010
CY079524	A/MG/10995/2009	A/MG/216/2007	A/PR/160/2009
CY079525	A/MG/10998/2009	A/MG/330/2005	A/PR/1600/2010
CY079526	A/MG/11401/2009	A/MG/332/2005	A/PR/1602/2010
CY079527	A/MG/11404/2009	A/MG/335/2007	A/PR/1604/2010
CY079528	A/MG/11405/2009	A/PR/112/2007	A/PR/1621/2009
AY972829	A/MG/154/2004	A/PR/116/2007	A/PR/261/2012
AY972827	A/MG/156/2004	A/PR/120/2007	A/PR/355/2011
AY972828	A/MG/160/2004	A/PR/126/2007	A/PR/404/2012
AY972831	A/MG/163/2004	A/PR/129/2007	A/PR/415/2012
CY099984	A/MG/239/2011	A/PR/145/2007	A/PR/417/2012
JN872420	A/MT/2011	A/PR/149/2007	A/PR/620/2011
EPI395227	A/PA/119244/2012	A/PR/152/2007	A/PR/839/2012
JN872418	A/PI/2011	A/PR/154/2007	A/PR/841/2012

JN872421	A/PI/2011	A/PR/161/2007	A/PR/851/2012
JN872423	A/PI/2011	A/PR/197/2007	A/RJ/1255/2011
JN872434	A/PI/2011	A/PR/199/2007	A/RJ/1264/2011
CY099986	A/PR/192/2011	A/PR/200/2007	A/RJ/1278/2010
CY099987	A/PR/199/2011	A/PR/296/2007	A/RJ/1307/2011
AY972842	A/PR/291/2004	A/PR/297/2007	A/RJ/1347/2011
AY972830	A/PR/298/2004	A/PR/314/2007	A/RJ/175/2012
AY972837	A/PR/306/2004	A/PR/317/2007	A/RJ/183/2012
AY972838	A/PR/308/2004	A/PR/319/2007	A/RJ/361/2012
AY972843	A/PR/313/2004	A/PR/333/2005	A/RJ/386/2011
AY972833	A/RJ/107/2003	A/PR/379/2004	A/RJ/671/2010
AY972847	A/RJ/17/2004	A/PR/380/2004	A/RJ/763/2012
AY972840	A/RJ/26/2004	A/RJ/11/2006	A/RJ/765/2012
CY099988	A/RJ/27/2011	A/RJ/122/2006	A/RJ/766/2012
AY968023	A/RJ/28/2000	A/RJ/14/2007	A/RJ/805/2010
AY972851	A/RJ/346/2003	A/RJ/142/2007	A/RS/1725/2010
AY968029	A/RJ/465/2001	A/RJ/149/2006	A/RS/1727/2010
AY968030	A/RJ/470/2001	A/RJ/190/2003	A/RS/847/2011
AY968031	A/RJ/471/2001	A/RJ/205/2002	A/RS/856/2011
AY968032	A/RJ/478/2001	A/RJ/209/2006	A/RS/871/2011
EPI279999	A/RJ/610/2010	A/RJ/21/2007	A/SC/1127/2011
EPI280002	A/RJ/791/2010	A/RJ/219/2007	A/SC/1703/2010
AY972834	A/RJ/98/2003	A/RJ/25/2007	A/SC/1710/2010
AY972832	A/RJ/99/2003	A/RJ/28/2007	A/SC/286/2011
JN872417	A/RO/2011	A/RJ/327/2002	A/SC/294/2011
AY968019	A/RS/21/1999	A/RJ/36/2004	A/SC/300/2011
AY972836	A/RS/211/2004	A/RJ/37/2004	A/SE/1564/2012
AY972835	A/RS/212/2004	A/RJ/62/2004	A/SE/1574/2012
AY972839	A/RS/213/2004	A/RJ/78/2007	
AY968020	A/RS/25/1999	A/RJ/799/2004	
AY972846	A/RS/406/2004	A/RJ/80/2007	
AY972841	A/RS/411/2004	A/RJ/812/2004	
AY972844	A/RS/417/2004	A/RJ/82/2007	
AY968038	A/SC/311/2002	A/RJ/89/2003	
AY968040	A/SC/339/2002	A/RJ/95/2007	
CY099989	A/SE/146/2011	A/RS/225/2007	
CY099990	A/SE/152/2011	A/RS/231/2007	
CY099991	A/SE/155/2011	A/RS/241/2007	
CY099993	A/SE/176/2011	A/RS/246/2007	
HM628692	A/SP/16363/2010	A/RS/251/2007	
JN872410	A/SP/2010	A/RS/255/2007	
JN872411	A/SP/2010	A/RS/264/2007	
JN872413	A/SP/2011	A/RS/270/2007	
JN872415	A/SP/2011	A/RS/271/2007	
JN872416	A/SP/2011	A/RS/280/2007	

JN872419	A/SP/2011	A/RS/287/2005
JN872422	A/SP/2011	A/RS/290/2005
JN872424	A/SP/2011	A/RS/293/2005
JN872425	A/SP/2011	A/RS/392/2005
JN872426	A/SP/2011	A/RS/441/2006
JN872429	A/SP/2011	A/RS/793/2006
JN872435	A/SP/2011	A/SC/187/2007
JN872438	A/SP/2011	A/SC/188/2007
JN872440	A/SP/2011	
JN872441	A/SP/2011	
JX679213	A/SP/2012	
KC291190	A/SP/2012	
KC291191	A/SP/2012	
JX679214	A/TO/2011	

9.8. APÊNDICE B: Lista com os números de acesso das sequências da Austrália, Hong Kong, Nova Iorque, Reino Unido e América do Sul (exceto Brasil) utilizadas

AUSTRALIA	HONG KONG	NOVA IORQUE	REINO UNIDO	AMÉRICA DO SUL
CY016068	AY035588	CY000721	JF710759	AF534032
CY016515	EU856815	CY001120	CY088493	AF534034
CY016635	EU856971	CY001349	CY088496	AF534056
EF566080	EU856983	CY001413	EU502452	AF534060
EF566087	EU856987	CY001656	EU502476	EU502111
CY016084	EU856896	CY001744	AM502720	EU501368
CY020309	EU856898	CY001912	AM502725	EU502106
CY020493	EU856922	CY002296	AM502736	EU502101
EF467799	EU856925	CY003600	AM502741	EU502522
CY015676	EU856951	CY003801	CY087969	EPI193977
CY017483	EU856954	CY000833	CY087970	EPI211340
EU501121	EU856960	CY003256	CY087972	EPI294004
CY017909	EU857036	CY000305	CY088102	EPI301342
EU501128	EU856910	EU103821	CY088174	EPI334613
EU501129	EU856918	CY000297	CY088270	EPI274456
EU501165	EU856946	CY000497	CY088350	DQ865972
EU501166	EU856980	CY001128	CY088366	EU502155
EU501178	EU857018	EU514663	CY088443	EU502157
CY015860	EU857031	CY000473	CY088475	EU502158
CY091181	EU857032	CY000513	DQ179485	EU502159
EF467800	EU857033	CY000865	DQ179491	EU502161
EU501208	DQ179394	CY000873	EU501246	EU502164
EU501238	EU514627	CY000909	EU501343	EU502035
EU501301	EU514641	CY000957	CY088488	EU502165
EU501329	EU514650	CY001013	CY088491	EPI278778
EF566058	EU856936	CY001021	CY088495	EPI371795
EF566161	EU857052	CY001648	CY088502	EPI384791
EU501378	EU501255	CY002520	CY088499	EPI387802
EU501381	EU501264	EU502299	CY088504	EPI394784
EU501574	EU501265	CY002048	CY088506	EPI232478
CY091421	EU856861	CY002216	CY088507	EPI241634
EF566254	EU856862	CY002408	CY088508	EPI270323
EU501616	EU857027	CY003072	CY088509	EU521923
EU501782	EU857044	CY007643	CY088510	EU502183
EU501873	EU857084	EF473625	CY088513	EU501926
EU501874	EU857086	EU501486	CY088516	EU502329
EU501881	EU857089	CY002464	CY088519	EPI301104
EU501883	CY039023	CY003056	CY088521	EU514647
CY030221	CY100228	CY006139	CY088524	DQ265708
CY031809	CY100276	CY019325	CY088549	EU521994

CY031843	EU501420	CY019333	CY088553	EU521881
EPI155960	EU856909	CY019827	CY088555	EU521890
EU199248	EU857021	CY054275	JF710750	EU521892
EPI161830	CY039055	EF473473	CY088445	EU522001
EPI162957	EU501668	CY025485	CY088561	CY070144
EPI162963	EU501671	CY025643	CY088562	EU521751
EPI162973	EU501677	CY025843	EPI215010	EU521754
EPI162986	EU857079	EU516047	EPI210093	EU521913
EPI168613	EU857082	CY036967	EPI210094	EU521915
EPI168615	EU155130	CY050452	EPI272100	EU521937
CY061898	EU501940	CY050540	EPI272103	EU521993
CY066511	EU502534	CY050564	EPI301360	EPI301068
CY121077	EU502536	CY050636	EPI301362	EU502396
EPI173254	CY121736	CY055083	EPI309725	EU521907
EPI186311	EPI214946	CY080450	EPI347614	JQ906846
EPI189218	EPI214948	CY084334	EPI368362	JQ906848
EPI210283	EPI214988	EPI270303	EPI368363	JQ906849
EPI228244	EPI272104	EPI301074	EPI368611	JQ906851
EPI228265	JN256689	EPI326317	EPI377303	
EPI228302	JN256691	CY112196		
CY121496	JN256693	EPI363022		
EPI271988	EPI279885	EPI366359		
EPI294080	EPI287145	EPI371981		
EPI294345	EPI302195	EPI377487		
EPI302391	EPI302197	EPI378219		
EPI331440	EPI302199	EPI398025		
EPI333052	EPI302201			
EPI346231	EPI352769			
EPI346240	EPI352775			
EPI346276	EPI353492			
EPI346299				
EPI346341				
EPI346362				
EPI346368				
EPI356610				
EPI357690				
EPI370051				
EPI370132				
EPI377444				
EPI379464				
EPI379466				
EPI379453				
EPI379488				
EPI393551				
EPI394096				

EPI394127
EPI394170
EPI394185
EPI394265
EPI394280
EPI394343
EPI394405
EPI394468
EPI395021
EPI395035
EPI395041
EPI397059

9.9. APÊNDICE C: Dados de distância genética para nucleotídeos, utilizando o método "Maximum Composite Likelihood" implementado no programa MEGA5.0. Foi considerado valores de distância menores do que 0,017 (valores destacados com cor), e para efeitos de comparação os menores valores (valores marcados com cor e borda), para classificar determinada sequência similar antigênicamente a cepa vacinal.

					Nucleotídeo									
					SY97	MW99	PA99	FU02	CA04	WL04	WI05	BI07	PE09	VI11
EF566075	A	Sydney	5	1997										
DQ487341	A	Moscow	10	1999	0,021									
DQ508865	A	Panama	2007	1999	0,018	0,023								
EF541397	A	Fujian	411	2002	0,043	0,046	0,027							
CY031795	A	California	7	2004	0,052	0,058	0,039	0,014						
CY012104	A	Wellington	1	2004	0,049	0,052	0,033	0,01	0,01					
CY034116	A	Wisconsin	67	2005	0,06	0,066	0,046	0,021	0,015	0,015				
CY035022	A	Brisbane	10	2007	0,06	0,066	0,046	0,02	0,017	0,013	0,008			
GQ293081	A	Perth	16	2009	0,069	0,075	0,055	0,028	0,026	0,021	0,017	0,008		
EPI377442	A	Victoria	361	2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,026	0,02	0,015	
AY968018	A	ES	14	1999	0,021	0,024	0,006	0,024	0,036	0,03	0,043	0,043	0,052	0,063
AY968017	A	ES	3	1999	0,024	0,027	0,008	0,027	0,039	0,033	0,046	0,046	0,055	0,066
AY968021	A	ES	33	1999	0,024	0,027	0,008	0,027	0,039	0,033	0,046	0,046	0,055	0,066
AY968020	A	RS	25	1999	0,023	0,026	0,007	0,025	0,037	0,031	0,044	0,044	0,054	0,064
AY968019	A	RS	21	1999	0,026	0,028	0,01	0,028	0,04	0,034	0,046	0,046	0,055	0,066
AY968024	A	ES	128	2000	0,021	0,024	0,011	0,033	0,045	0,039	0,052	0,052	0,061	0,072
AY968023	A	RJ	28	2000	0,024	0,027	0,014	0,036	0,048	0,042	0,055	0,055	0,064	0,075
AY968028	A	ES	454	2001	0,026	0,03	0,014	0,036	0,048	0,042	0,055	0,055	0,064	0,075
AY968029	A	RJ	465	2001	0,033	0,04	0,027	0,049	0,061	0,055	0,069	0,069	0,077	0,088
AY968030	A	RJ	470	2001	0,028	0,033	0,02	0,042	0,051	0,045	0,058	0,058	0,066	0,077
AY968031	A	RJ	471	2001	0,027	0,031	0,018	0,04	0,052	0,046	0,06	0,06	0,067	0,078
AY968032	A	RJ	478	2001	0,026	0,028	0,011	0,03	0,041	0,036	0,049	0,049	0,058	0,069

	A	RJ	205	2002	0,027	0,03	0,013	0,031	0,043	0,037	0,05	0,05	0,06	0,069
AY968041	A	ES	88	2002	0,031	0,034	0,017	0,034	0,046	0,04	0,053	0,05	0,06	0,07
AY968040	A	SC	339	2002	0,033	0,036	0,018	0,037	0,049	0,043	0,056	0,056	0,064	0,075
EU514644	A	CE	177	2002	0,033	0,036	0,015	0,036	0,047	0,041	0,055	0,055	0,064	0,072
AY968038	A	SC	311	2002	0,03	0,033	0,015	0,034	0,046	0,04	0,053	0,053	0,063	0,073
	A	RJ	327	2002	0,028	0,031	0,017	0,033	0,042	0,039	0,049	0,049	0,058	0,069
	A	RJ	89	2003	0,052	0,055	0,036	0,013	0,024	0,017	0,033	0,03	0,039	0,049
	A	RJ	190	2003	0,028	0,03	0,017	0,033	0,042	0,039	0,049	0,049	0,058	0,069
AY972851	A	RJ	346	2003	0,039	0,041	0,024	0,028	0,04	0,034	0,044	0,047	0,057	0,064
AY972833	A	RJ	107	2003	0,046	0,049	0,03	0,007	0,018	0,011	0,027	0,024	0,033	0,043
AY972834	A	RJ	98	2003	0,051	0,054	0,034	0,011	0,023	0,015	0,031	0,028	0,037	0,048
AY972832	A	RJ	99	2003	0,046	0,049	0,03	0,007	0,018	0,011	0,027	0,024	0,033	0,043
	A	RJ	812	2004	0,058	0,061	0,041	0,02	0,017	0,013	0,023	0,023	0,031	0,04
	A	RJ	799	2004	0,057	0,063	0,043	0,021	0,015	0,014	0,021	0,021	0,03	0,039
	A	RJ	62	2004	0,049	0,052	0,033	0,01	0,01	0,003	0,018	0,015	0,024	0,034
	A	RJ	37	2004	0,051	0,054	0,034	0,011	0,011	0,004	0,02	0,017	0,026	0,036
	A	PR	380	2004	0,049	0,052	0,033	0,01	0,01	0,003	0,018	0,015	0,024	0,034
	A	RJ	36	2004	0,058	0,061	0,042	0,018	0,018	0,011	0,027	0,024	0,033	0,043
AY972847	A	RJ	17	2004	0,051	0,054	0,034	0,011	0,011	0,004	0,02	0,017	0,026	0,036
AY972840	A	RJ	26	2004	0,052	0,055	0,036	0,013	0,013	0,006	0,018	0,015	0,024	0,034
AY972842	A	PR	291	2004	0,053	0,056	0,037	0,014	0,014	0,007	0,02	0,017	0,026	0,036
AY972830	A	PR	298	2004	0,053	0,056	0,037	0,014	0,014	0,007	0,02	0,017	0,026	0,036
AY972837	A	PR	306	2004	0,051	0,054	0,034	0,011	0,023	0,015	0,031	0,025	0,034	0,043
AY972838	A	PR	308	2004	0,049	0,052	0,033	0,01	0,021	0,014	0,03	0,024	0,033	0,042
AY972843	A	PR	313	2004	0,051	0,056	0,037	0,014	0,011	0,007	0,017	0,014	0,023	0,033
AY972839	A	RS	213	2004	0,045	0,048	0,028	0,006	0,017	0,01	0,025	0,023	0,031	0,042
AY972829	A	MG	154	2004	0,048	0,051	0,031	0,008	0,008	0,001	0,017	0,014	0,023	0,033
AY972827	A	MG	156	2004	0,048	0,051	0,031	0,008	0,008	0,001	0,017	0,014	0,023	0,033
AY972828	A	MG	160	2004	0,051	0,054	0,034	0,011	0,011	0,004	0,02	0,017	0,026	0,036
AY972831	A	MG	163	2004	0,052	0,055	0,036	0,013	0,013	0,006	0,021	0,018	0,027	0,037

AY972836	A	RS	211	2004	0,045	0,048	0,028	0,007	0,018	0,011	0,027	0,024	0,033	0,043
AY972835	A	RS	212	2004	0,045	0,048	0,028	0,006	0,017	0,01	0,025	0,023	0,031	0,042
AY972846	A	RS	406	2004	0,052	0,054	0,036	0,013	0,013	0,006	0,021	0,018	0,027	0,034
AY972841	A	RS	411	2004	0,054	0,057	0,037	0,014	0,014	0,007	0,02	0,017	0,026	0,036
AY972844	A	RS	417	2004	0,055	0,058	0,039	0,015	0,015	0,008	0,021	0,018	0,027	0,037
	A	PR	379	2004	0,048	0,051	0,031	0,008	0,008	0,001	0,017	0,014	0,023	0,033
	A	BA	366	2005	0,054	0,06	0,04	0,017	0,011	0,01	0,02	0,017	0,026	0,036
	A	RS	293	2005	0,052	0,055	0,036	0,013	0,013	0,006	0,018	0,015	0,024	0,034
	A	RS	290	2005	0,054	0,057	0,037	0,014	0,014	0,007	0,02	0,017	0,026	0,036
	A	RS	287	2005	0,052	0,055	0,036	0,013	0,013	0,006	0,018	0,015	0,024	0,034
	A	RS	392	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	MG	332	2005	0,051	0,057	0,037	0,014	0,008	0,007	0,017	0,014	0,023	0,034
	A	MG	330	2005	0,051	0,057	0,037	0,013	0,007	0,008	0,017	0,015	0,024	0,034
	A	ES	353	2005	0,049	0,052	0,033	0,01	0,01	0,003	0,018	0,015	0,024	0,034
	A	PR	333	2005	0,06	0,063	0,043	0,021	0,018	0,014	0,024	0,021	0,03	0,039
	A	CE	60	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	CE	76	2005	0,054	0,06	0,04	0,018	0,013	0,011	0,021	0,018	0,027	0,039
	A	CE	64	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	CE	63	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	CE	74	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	CE	75	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	CE	66	2005	0,052	0,058	0,039	0,015	0,01	0,008	0,018	0,015	0,024	0,036
	A	RS	793	2006	0,06	0,066	0,046	0,02	0,017	0,013	0,008	0,003	0,011	0,023
	A	RJ	209	2006	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,007	0,015	0,027
	A	RJ	122	2006	0,06	0,066	0,046	0,02	0,017	0,013	0,008	0,003	0,011	0,023
	A	ES	294	2006	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,006	0,014	0,026
	A	RS	441	2006	0,061	0,067	0,047	0,021	0,018	0,014	0,01	0,004	0,013	0,024
	A	RJ	149	2006	0,06	0,066	0,046	0,02	0,017	0,013	0,008	0,003	0,011	0,023
	A	RJ	11	2006	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,008	0,017	0,028
	A	CE	59	2006	0,049	0,055	0,036	0,013	0,007	0,006	0,015	0,013	0,021	0,033

A	PR	317	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,01	0,021
A	PR	319	2007	0,066	0,072	0,052	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,01	0,021
A	PR	314	2007	0,061	0,067	0,051	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,01	0,021
A	PR	297	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	PR	296	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,008	0,02
A	PR	200	2007	0,064	0,071	0,051	0,024	0,021	0,017	0,013	0,007	0,011	0,023
A	PR	199	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,013	0,024
A	MG	335	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	BA	70	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,008	0,02
A	BA	65	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	BA	58	2007	0,061	0,067	0,047	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,01	0,021
A	BA	53	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	BA	50	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	SC	188	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,013	0,024
A	SC	187	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	RJ	95	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	RJ	82	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,01	0,021
A	RJ	28	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	RJ	25	2007	0,061	0,067	0,047	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,01	0,021
A	RJ	21	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	RJ	142	2007	0,064	0,07	0,05	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,01	0,021
A	RJ	14	2007	0,06	0,066	0,046	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,011	0,023
A	PR	197	2007	0,066	0,072	0,052	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,01	0,021
A	PR	161	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	PR	154	2007	0,066	0,072	0,052	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,01	0,021
A	PR	152	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,01	0,021
A	PR	149	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,013	0,024
A	PR	145	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	PR	129	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	PR	126	2007	0,066	0,072	0,052	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,01	0,021

A	PR	120	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	PR	112	2007	0,064	0,07	0,051	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,008	0,02
A	MG	216	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	MG	204	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,008	0,02
A	MG	202	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	MG	109	2007	0,06	0,066	0,046	0,02	0,017	0,013	0,008	0	0,008	0,02
A	MG	105	2007	0,061	0,067	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,004	0,008	0,02
A	BA	45	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	BA	12	2007	0,064	0,07	0,05	0,024	0,021	0,017	0,013	0,007	0,015	0,027
A	RS	280	2007	0,066	0,072	0,052	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,011	0,023
A	RS	271	2007	0,066	0,072	0,052	0,025	0,023	0,018	0,014	0,006	0,01	0,021
A	RS	270	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	RS	264	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	RS	255	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	RS	251	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	RS	246	2007	0,061	0,067	0,048	0,021	0,018	0,014	0,01	0,001	0,007	0,018
A	RS	241	2007	0,064	0,07	0,05	0,023	0,02	0,018	0,013	0,006	0,014	0,025
A	RS	231	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,008	0,02
A	RS	225	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,008	0,02
A	RJ	80	2007	0,063	0,069	0,049	0,025	0,023	0,018	0,011	0,006	0,014	0,023
A	RJ	78	2007	0,06	0,066	0,046	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,011	0,023
A	RJ	219	2007	0,063	0,069	0,049	0,023	0,02	0,015	0,011	0,003	0,007	0,018
A	BA	11228	2009	0,067	0,074	0,053	0,027	0,024	0,02	0,015	0,007	0,007	0,018
A	AL	383	2009	0,067	0,074	0,054	0,027	0,024	0,02	0,015	0,007	0,007	0,018
A	AL	4881	2009	0,067	0,074	0,054	0,027	0,024	0,02	0,015	0,007	0,007	0,018
A	AL	5204	2009	0,071	0,077	0,057	0,03	0,027	0,023	0,018	0,01	0,01	0,015
A	BA	204	2009	0,068	0,075	0,055	0,028	0,026	0,021	0,02	0,011	0,017	0,028
A	BA	3551	2009	0,067	0,074	0,054	0,027	0,024	0,02	0,015	0,007	0,007	0,017
A	BA	474	2009	0,071	0,078	0,058	0,031	0,028	0,024	0,02	0,011	0,011	0,02
A	PR	160	2009	0,072	0,078	0,058	0,031	0,03	0,024	0,021	0,013	0,008	0,007

CY079524	A	MG	10995	2009	0,072	0,078	0,058	0,031	0,028	0,024	0,02	0,011	0,011	0,023
CY079525	A	MG	10998	2009	0,072	0,078	0,058	0,031	0,028	0,024	0,02	0,011	0,011	0,023
CY079526	A	MG	11401	2009	0,072	0,078	0,058	0,031	0,028	0,024	0,02	0,011	0,011	0,023
CY079527	A	MG	11404	2009	0,072	0,078	0,058	0,031	0,028	0,024	0,02	0,011	0,011	0,023
CY079528	A	MG	11405	2009	0,071	0,077	0,057	0,03	0,027	0,023	0,018	0,01	0,008	0,014
	A	PR	1621	2009	0,07	0,077	0,056	0,03	0,027	0,023	0,018	0,01	0,01	0,021
HM628692	A	SP	16363	2010	0,072	0,078	0,058	0,031	0,028	0,024	0,02	0,011	0,003	0,018
EPI280002	A	RJ	791	2010	0,078	0,085	0,064	0,037	0,034	0,03	0,023	0,017	0,008	0,021
EPI279999	A	RJ	610	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,033	0,028	0,024	0,018	0,011	0,023
HM628693	A	AC	15093	2010	0,079	0,085	0,064	0,037	0,034	0,03	0,023	0,017	0,008	0,021
HM628694	A	AC	26954	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,033	0,028	0,024	0,015	0,007	0,023
	A	BA	650	2010	0,08	0,086	0,066	0,039	0,036	0,031	0,024	0,018	0,01	0,023
	A	BA	547	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,033	0,028	0,021	0,015	0,007	0,02
	A	BA	690	2010	0,078	0,085	0,064	0,037	0,034	0,03	0,023	0,017	0,008	0,021
	A	BA	855	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,033	0,028	0,021	0,015	0,007	0,02
	A	PR	1598	2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,006
	A	PR	1600	2010	0,078	0,085	0,064	0,037	0,034	0,03	0,023	0,017	0,008	0,021
	A	PR	1602	2010	0,08	0,086	0,066	0,039	0,036	0,031	0,024	0,018	0,01	0,023
	A	PR	1604	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,034	0,028	0,026	0,017	0,013	0,011
	A	RJ	1278	2010	0,078	0,085	0,066	0,039	0,036	0,031	0,024	0,018	0,01	0,023
	A	RJ	671	2010	0,078	0,085	0,064	0,037	0,034	0,03	0,023	0,017	0,008	0,021
	A	BA	484	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,033	0,028	0,021	0,015	0,007	0,02
	A	BA	569	2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,033	0,028	0,021	0,015	0,007	0,02
	A	RS	1727	2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,006
	A	RS	1725	2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,006
	A	SC	1703	2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,015	0,011	0,007
	A	SC	1710	2010	0,077	0,083	0,063	0,034	0,033	0,03	0,026	0,018	0,014	0,013
JN872405	A	DF		2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,008
JN872406	A	DF		2010	0,075	0,082	0,061	0,034	0,033	0,027	0,024	0,015	0,011	0,01
JN872407	A	DF		2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,008

JN872408	A	DF		2010	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
JN872409	A	DF		2010	0,077	0,083	0,063	0,036	0,034	0,028	0,026	0,017	0,013	0,011
JN872412	A	GO		2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,006
JN872410	A	SP		2010	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,008
JN872411	A	SP		2010	0,078	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,011
	A	MG	1116	2011	0,077	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,01
CY099979	A	BA	44	2011	0,077	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,01
CY099980	A	BA	45	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
CY099981	A	BA	65	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
CY099982	A	BA	97	2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
CY099989	A	SE	146	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
CY099990	A	SE	152	2011	0,077	0,083	0,063	0,036	0,034	0,028	0,026	0,017	0,013	0,011
CY099991	A	SE	155	2011	0,077	0,083	0,063	0,036	0,034	0,028	0,026	0,017	0,013	0,011
CY099993	A	SE	176	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
CY099984	A	MG	239	2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
CY099986	A	PR	192	2011	0,08	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,013
CY099987	A	PR	199	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	MG	599	2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	PR	1354	2011	0,082	0,088	0,067	0,042	0,04	0,037	0,034	0,025	0,021	0,02
	A	PR	1358	2011	0,082	0,088	0,067	0,042	0,04	0,037	0,034	0,025	0,021	0,02
	A	PR	355	2011	0,081	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
	A	PR	620	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	RJ	1255	2011	0,077	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,01
	A	RJ	1264	2011	0,077	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,01
	A	RJ	1347	2011	0,079	0,086	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,013
	A	RJ	386	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	RS	847	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	RS	856	2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	RS	871	2011	0,077	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	SC	1127	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013

	A	SC	286	2011	0,075	0,082	0,061	0,034	0,031	0,027	0,026	0,017	0,008	0,024
	A	SC	294	2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	SC	300	2011	0,079	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
JN872427	A	DF		2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
JN872414	A	GO		2011	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
JN872420	A	MT		2011	0,082	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
JN872423	A	PI		2011	0,075	0,082	0,061	0,034	0,033	0,027	0,024	0,015	0,011	0,01
JN872421	A	PI		2011	0,079	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
JN872418	A	PI		2011	0,074	0,08	0,06	0,033	0,031	0,026	0,023	0,014	0,01	0,006
JN872417	A	RO		2011	0,082	0,088	0,067	0,04	0,037	0,033	0,026	0,02	0,011	0,024
JN872415	A	SP		2011	0,077	0,083	0,063	0,036	0,034	0,028	0,026	0,017	0,013	0,011
JN872441	A	SP		2011	0,081	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
JN872413	A	SP		2011	0,079	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,011
JN872429	A	SP		2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
JN872416	A	SP		2011	0,077	0,083	0,063	0,036	0,034	0,028	0,026	0,017	0,013	0,011
JN872422	A	SP		2011	0,077	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
JN872438	A	SP		2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
JN872424	A	SP		2011	0,077	0,083	0,063	0,034	0,033	0,03	0,026	0,018	0,014	0,013
JN872425	A	SP		2011	0,075	0,082	0,061	0,034	0,033	0,027	0,024	0,015	0,011	0,01
JN872426	A	SP		2011	0,078	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
JN872419	A	SP		2011	0,077	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,01
JX679214	A	TO		2011	0,083	0,089	0,072	0,045	0,043	0,037	0,034	0,025	0,021	0,02
JN872435	A	SP		2011	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
EPI395227	A	PA	119244	2012	0,08	0,086	0,066	0,039	0,036	0,031	0,027	0,018	0,014	0,015
	A	RJ	361	2012	0,081	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
	A	ES	450	2012	0,081	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
	A	PR	261	2012	0,083	0,089	0,069	0,042	0,04	0,034	0,031	0,023	0,018	0,017
	A	BA	1213	2012	0,083	0,089	0,069	0,042	0,04	0,034	0,031	0,023	0,018	0,017
	A	MG	41	2012	0,077	0,083	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	MG	42	2012	0,079	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,011

	A	PR	1192	2012	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	PR	415	2012	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	PR	839	2012	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	PR	417	2012	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	PR	841	2012	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
	A	PR	851	2012	0,078	0,085	0,064	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,015
	A	RJ	175	2012	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
	A	RJ	763	2012	0,083	0,089	0,069	0,042	0,04	0,034	0,031	0,023	0,018	0,017
	A	RJ	765	2012	0,083	0,089	0,069	0,042	0,04	0,034	0,031	0,023	0,018	0,017
	A	RJ	766	2012	0,083	0,089	0,069	0,042	0,04	0,034	0,031	0,023	0,018	0,017
	A	SE	1564	2012	0,081	0,088	0,067	0,04	0,039	0,033	0,03	0,021	0,017	0,013
	A	SE	1574	2012	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
KC291190	A	SP		2012	0,08	0,086	0,066	0,039	0,037	0,031	0,028	0,02	0,015	0,014
KC291191	A	SP		2012	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013
JX679213	A	SP		2012	0,078	0,085	0,064	0,037	0,036	0,03	0,027	0,018	0,014	0,013

SY97, A/Sydney/5/1997-like; MW99, A/Moscow/10/1999-like; PA99, A/Panama/2007/1999-like; FU02, A/Fujian/411/2002-like; CA04, A/California/7/2004-like; WL04, A/Wellington/01/2004-like; WI05, A/Wisconsin/67/2005-like; BI07, A/Brisbane/10/2007-like; PE09, A/Perth/16/2009-like; VI11, A/Victoria/361/2011-like.

9.10. APÊNDICE D: Dados de número de diferenças de aminoácidos. Foi considerado valores de distância menores do que 10 (valores destacados com cor), e para efeitos de comparação os menores valores (valores marcados com cor e borda), para classificar determinada sequência similar antigênicamente a cepa vacinal.

					Aminoácido									
					SY97	MW99	PA99	FU02	CA04	WL04	WI05	BI07	PE09	VI11
EF566075	A	Sydney	5	1997										
DQ487341	A	Moscow	10	1999	12									
DQ508865	A	Panama	2007	1999	10	10								
EF541397	A	Fujian	411	2002	17	16	9							
CY031795	A	California	7	2004	23	22	17	8						
CY012104	A	Wellington	1	2004	20	18	12	3	5					
CY034116	A	Wisconsin	67	2005	24	24	18	10	6	7				
CY035022	A	Brisbane	10	2007	22	22	16	9	7	6	5			
GQ293081	A	Perth	16	2009	24	23	19	12	11	10	9	4		
EPI377442	A	Victoria	361	2011	28	27	22	15	14	13	10	7	5	
AY968018	A	ES	14	1999	10	9	2	7	15	10	16	14	17	20
AY968017	A	ES	3	1999	12	11	4	9	17	12	18	16	19	22
AY968021	A	ES	33	1999	12	11	4	9	17	12	18	16	19	22
AY968020	A	RS	25	1999	11	10	3	8	16	11	17	15	18	21
AY968019	A	RS	21	1999	13	12	5	10	18	13	18	16	19	22
AY968024	A	ES	128	2000	11	10	5	10	18	13	19	17	19	23
AY968023	A	RJ	28	2000	13	12	7	12	20	15	21	19	21	25
AY968028	A	ES	454	2001	10	10	5	10	18	13	19	17	19	23
AY968029	A	RJ	465	2001	11	12	7	12	20	15	21	19	20	24
AY968030	A	RJ	470	2001	13	12	7	12	18	13	19	17	19	23
AY968031	A	RJ	471	2001	12	11	6	11	19	14	20	18	19	23
AY968032	A	RJ	478	2001	10	10	4	9	17	12	18	16	18	22
	A	RJ	205	2002	10	9	3	8	16	11	17	15	17	21
AY968041	A	ES	88	2002	12	11	5	9	17	12	18	16	18	22

AY968040	A	SC	339	2002	12	11	5	10	18	13	19	17	19	23
EU514644	A	CE	177	2002	12	11	3	10	18	13	19	17	19	23
AY968038	A	SC	311	2002	11	10	4	9	17	12	18	16	18	22
	A	RJ	327	2002	12	11	6	9	14	11	16	14	17	20
	A	RJ	89	2003	18	17	10	1	9	4	11	10	13	16
	A	RJ	190	2003	11	10	5	8	13	10	15	13	16	19
AY972851	A	RJ	346	2003	16	15	8	7	15	10	15	16	19	20
AY972833	A	RJ	107	2003	18	17	10	1	9	4	11	10	13	16
AY972834	A	RJ	98	2003	19	18	11	2	10	5	12	11	14	17
AY972832	A	RJ	99	2003	18	17	10	1	9	4	11	10	13	16
	A	RJ	812	2004	24	22	16	7	7	4	7	8	12	13
	A	RJ	799	2004	22	22	16	7	5	4	5	6	10	11
	A	RJ	62	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
	A	RJ	37	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
	A	PR	380	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
	A	RJ	36	2004	26	24	18	9	11	6	13	12	16	19
AY972847	A	RJ	17	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
AY972840	A	RJ	26	2004	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
AY972842	A	PR	291	2004	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
AY972830	A	PR	298	2004	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
AY972837	A	PR	306	2004	20	19	12	4	12	7	14	11	14	16
AY972838	A	PR	308	2004	19	18	11	3	11	6	13	10	13	15
AY972843	A	PR	313	2004	19	20	14	5	5	2	7	6	10	13
AY972839	A	RS	213	2004	18	17	10	1	9	4	11	10	13	16
AY972829	A	MG	154	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
AY972827	A	MG	156	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
AY972828	A	MG	160	2004	22	20	14	5	7	2	9	8	12	15
AY972831	A	MG	163	2004	23	21	15	6	8	3	10	9	13	16
AY972836	A	RS	211	2004	18	17	10	1	9	4	11	10	13	16
AY972835	A	RS	212	2004	18	17	10	1	9	4	11	10	13	16

AY972846	A	RS	406	2004	21	19	13	4	6	1	8	7	11	12
AY972841	A	RS	411	2004	21	20	14	5	7	2	9	8	12	15
AY972844	A	RS	417	2004	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
	A	PR	379	2004	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
	A	BA	366	2005	22	22	16	7	5	4	7	6	10	12
	A	RS	293	2005	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
	A	RS	290	2005	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
	A	RS	287	2005	20	19	13	4	6	1	8	7	11	14
	A	RS	392	2005	20	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	MG	332	2005	20	20	14	5	3	2	5	4	8	11
	A	MG	330	2005	20	20	14	5	3	2	5	4	8	11
	A	ES	353	2005	20	18	12	3	5	0	7	6	10	13
	A	PR	333	2005	25	23	17	9	9	6	9	8	12	13
	A	CE	60	2005	20	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	CE	76	2005	20	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	CE	64	2005	20	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	CE	63	2005	20	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	CE	74	2005	21	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	CE	75	2005	21	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	CE	66	2005	20	21	15	6	4	3	6	5	9	12
	A	RS	793	2006	21	21	15	8	6	5	4	1	5	8
	A	RJ	209	2006	23	23	17	10	8	7	6	3	7	10
	A	RJ	122	2006	21	21	15	8	6	5	4	1	5	8
	A	ES	294	2006	21	21	15	8	6	5	4	1	5	8
	A	RS	441	2006	21	21	15	8	6	5	4	1	5	8
	A	RJ	149	2006	21	21	15	8	6	5	4	1	5	8
	A	RJ	11	2006	23	23	17	9	7	6	5	4	8	11
	A	CE	59	2006	20	20	14	5	3	2	5	4	8	11
	A	PR	317	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
	A	PR	319	2007	24	24	18	11	9	8	7	2	5	8

A	PR	314	2007	21	21	17	10	8	7	6	1	5	8
A	PR	297	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	PR	296	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	PR	200	2007	23	23	18	10	8	7	6	3	7	10
A	PR	199	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	5	8
A	MG	335	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	BA	70	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	BA	65	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	BA	58	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	BA	53	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	BA	50	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	SC	188	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	5	8
A	SC	187	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	RJ	95	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	RJ	82	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	RJ	28	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	RJ	25	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	RJ	21	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	RJ	142	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	RJ	14	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	PR	197	2007	22	22	17	10	8	7	6	1	5	8
A	PR	161	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	PR	154	2007	22	22	17	10	8	7	6	1	5	8
A	PR	152	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	PR	149	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	5	8
A	PR	145	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	PR	129	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7
A	PR	126	2007	22	22	17	10	8	7	6	1	5	8
A	PR	120	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7
A	PR	112	2007	22	22	17	10	8	7	6	1	5	8

A	MG	216	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	MG	204	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	MG	202	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	MG	109	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7	
A	MG	105	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	BA	45	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	BA	12	2007	21	21	15	8	6	5	4	1	5	8	
A	RS	280	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7	
A	RS	271	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	RS	270	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	RS	264	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	RS	255	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	RS	251	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	RS	246	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7	
A	RS	241	2007	24	24	18	11	9	8	7	2	6	9	
A	RS	231	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7	
A	RS	225	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7	
A	RJ	80	2007	23	23	17	10	8	7	4	1	5	6	
A	RJ	78	2007	22	22	16	9	7	6	5	0	4	7	
A	RJ	219	2007	23	23	17	10	8	7	6	1	4	7	
A	BA	11228	2009	24	23	18	11	9	8	7	2	3	6	
A	AL	383	2009	23	23	17	10	8	7	6	1	3	6	
A	AL	4881	2009	23	23	17	10	8	7	6	1	3	6	
A	AL	5204	2009	23	23	17	10	8	7	6	1	3	6	
A	BA	204	2009	23	24	18	12	10	9	8	3	6	9	
A	BA	3551	2009	24	24	18	11	9	8	7	2	4	6	
A	BA	474	2009	23	23	17	10	8	7	6	1	3	6	
A	PR	160	2009	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4	
CY079524	A	MG	10995	2009	25	24	19	12	10	9	8	3	4	7
CY079525	A	MG	10998	2009	25	24	19	12	10	9	8	3	4	7

CY079526	A	MG	11401	2009	25	24	19	12	10	9	8	3	4	7
CY079527	A	MG	11404	2009	25	24	19	12	10	9	8	3	4	7
CY079528	A	MG	11405	2009	24	24	18	11	9	8	7	2	4	7
	A	PR	1621	2009	24	24	18	11	9	8	7	2	4	7
HM628692	A	SP	16363	2010	25	24	20	13	12	11	10	5	1	6
EPI280002	A	RJ	791	2010	28	27	23	16	15	14	11	8	4	7
EPI279999	A	RJ	610	2010	28	27	23	15	13	12	11	8	6	9
HM628693	A	AC	15093	2010	27	26	22	15	14	13	10	7	3	6
HM628694	A	AC	26954	2010	25	24	20	13	12	11	10	5	1	6
	A	BA	650	2010	28	27	23	16	15	14	11	8	4	7
	A	BA	547	2010	27	26	22	15	14	13	10	7	3	6
	A	BA	690	2010	27	26	23	16	15	14	11	8	4	7
	A	BA	855	2010	27	26	22	15	14	13	10	7	3	6
	A	PR	1598	2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	3
	A	PR	1600	2010	28	27	23	16	15	14	11	8	4	7
	A	PR	1602	2010	28	27	23	16	15	14	11	8	4	7
	A	PR	1604	2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RJ	1278	2010	27	26	22	15	14	13	10	7	3	6
	A	RJ	671	2010	28	27	23	16	15	14	11	8	4	7
	A	BA	484	2010	27	26	22	15	14	13	10	7	3	6
	A	BA	569	2010	27	26	22	15	14	13	10	7	3	6
	A	RS	1727	2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	3
	A	RS	1725	2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	3
	A	SC	1703	2010	25	24	19	12	11	10	9	5	3	4
	A	SC	1710	2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872405	A	DF		2010	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4
JN872406	A	DF		2010	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4
JN872407	A	DF		2010	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4
JN872408	A	DF		2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872409	A	DF		2010	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4

JN872412	A	GO		2010	25	24	19	12	11	10	9	4	2	3
JN872410	A	SP		2010	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4
JN872411	A	SP		2010	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
	A	MG	1116	2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
CY099979	A	BA	44	2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
CY099980	A	BA	45	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099981	A	BA	65	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099982	A	BA	97	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099989	A	SE	146	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099990	A	SE	152	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099991	A	SE	155	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099993	A	SE	176	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099984	A	MG	239	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
CY099986	A	PR	192	2011	27	27	22	15	14	13	12	7	5	6
CY099987	A	PR	199	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	MG	599	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	1354	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	1358	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	355	2011	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
	A	PR	620	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RJ	1255	2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
	A	RJ	1264	2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
	A	RJ	1347	2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
	A	RJ	386	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RS	847	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RS	856	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RS	871	2011	24	25	20	13	12	11	10	5	3	6
	A	SC	1127	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	SC	286	2011	25	24	20	13	12	11	10	5	1	6
	A	SC	294	2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5

	A	SC	300	2011	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
JN872427	A	DF		2011	26	25	19	13	12	11	10	5	3	6
JN872414	A	GO		2011	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
JN872420	A	MT		2011	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
JN872423	A	PI		2011	24	23	18	11	10	9	8	3	1	4
JN872421	A	PI		2011	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
JN872418	A	PI		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	3
JN872417	A	RO		2011	27	26	22	15	15	13	11	9	5	8
JN872415	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872441	A	SP		2011	27	26	21	14	13	12	11	6	4	7
JN872413	A	SP		2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
JN872429	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872416	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872422	A	SP		2011	24	25	20	13	12	11	10	5	3	6
JN872438	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872424	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872425	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JN872426	A	SP		2011	25	26	21	14	13	12	11	6	4	7
JN872419	A	SP		2011	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
JX679214	A	TO		2011	26	25	20	13	12	11	10	6	4	7
JN872435	A	SP		2011	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
EPI395227	A	PA	119244	2012	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
	A	RJ	361	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	ES	450	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	261	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	BA	1213	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	MG	41	2012	24	23	20	13	12	11	10	5	3	6
	A	MG	42	2012	26	26	21	14	13	12	11	6	4	5
	A	PR	1192	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	415	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5

	A	PR	839	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	417	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	841	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	PR	851	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RJ	175	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RJ	763	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RJ	765	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	RJ	766	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
	A	SE	1564	2012	27	26	21	14	13	12	11	6	4	5
	A	SE	1574	2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
KC291190	A	SP		2012	26	25	20	13	12	11	10	5	3	6
KC291191	A	SP		2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5
JX679213	A	SP		2012	25	24	19	12	11	10	9	4	2	5

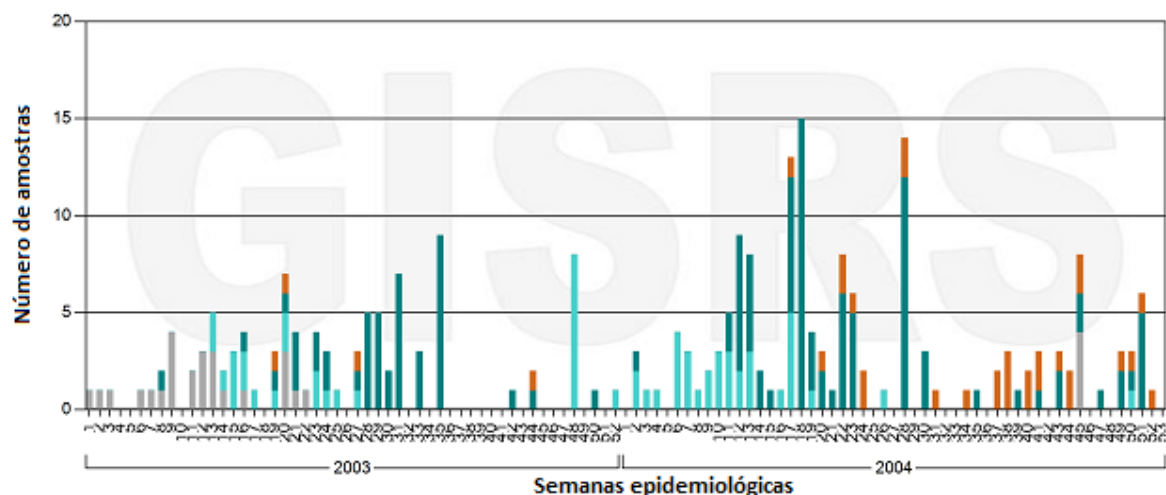
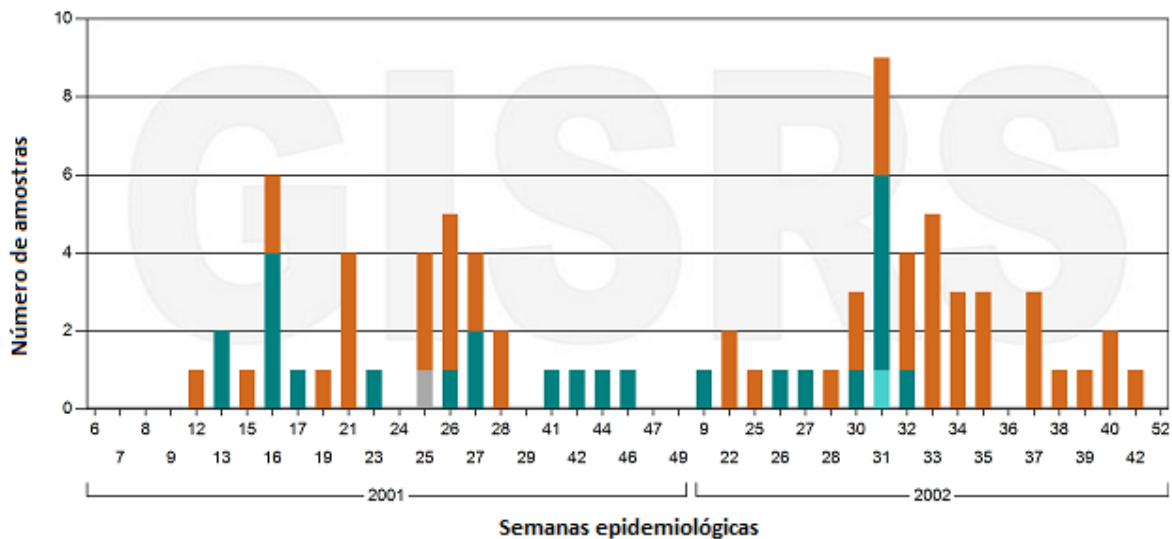
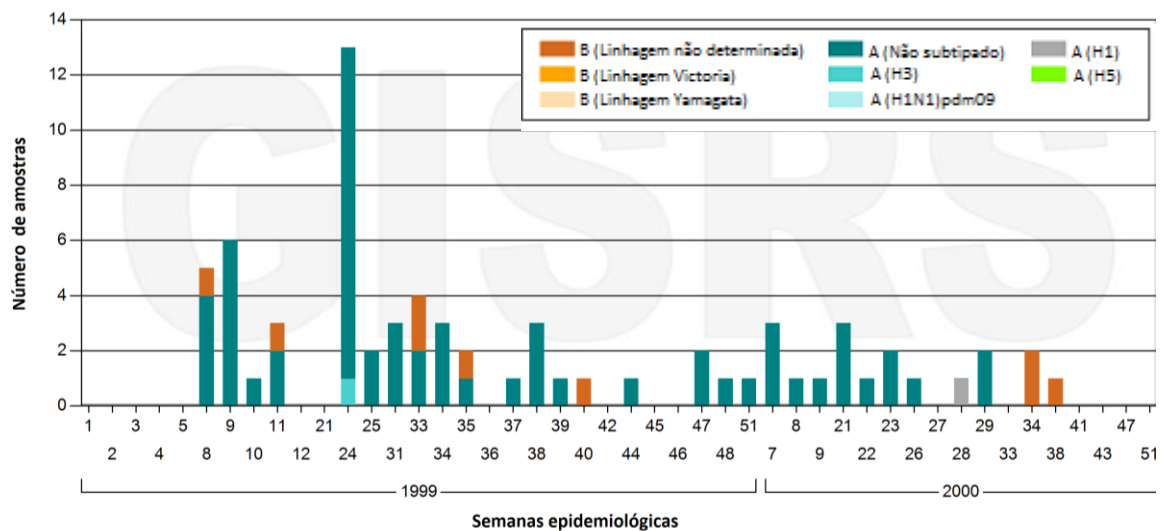
SY97, A/Sydney/5/1997-like; MW99, A/Moscow/10/1999-like; PA99, A/Panama/2007/1999-like; FU02, A/Fujian/411/2002-like; CA04, A/California/7/2004-like; WL04, A/Wellington/01/2004-like; WI05, A/Wisconsin/67/2005-like; BI07, A/Brisbane/10/2007-like; PE09, A/Perth/16/2009-like; VI11, A/Victoria/361/2011-like.

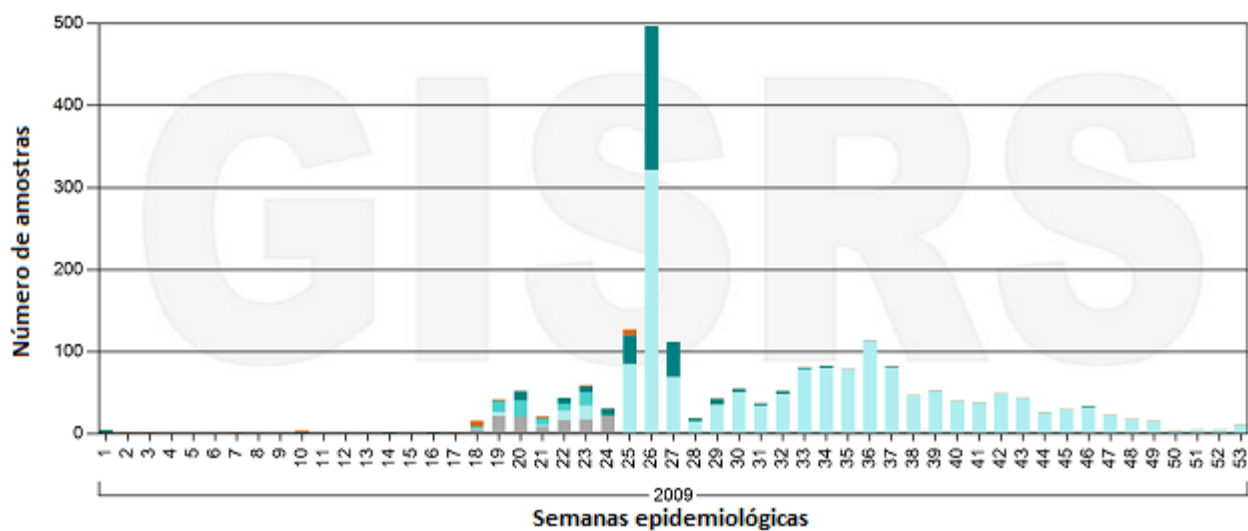
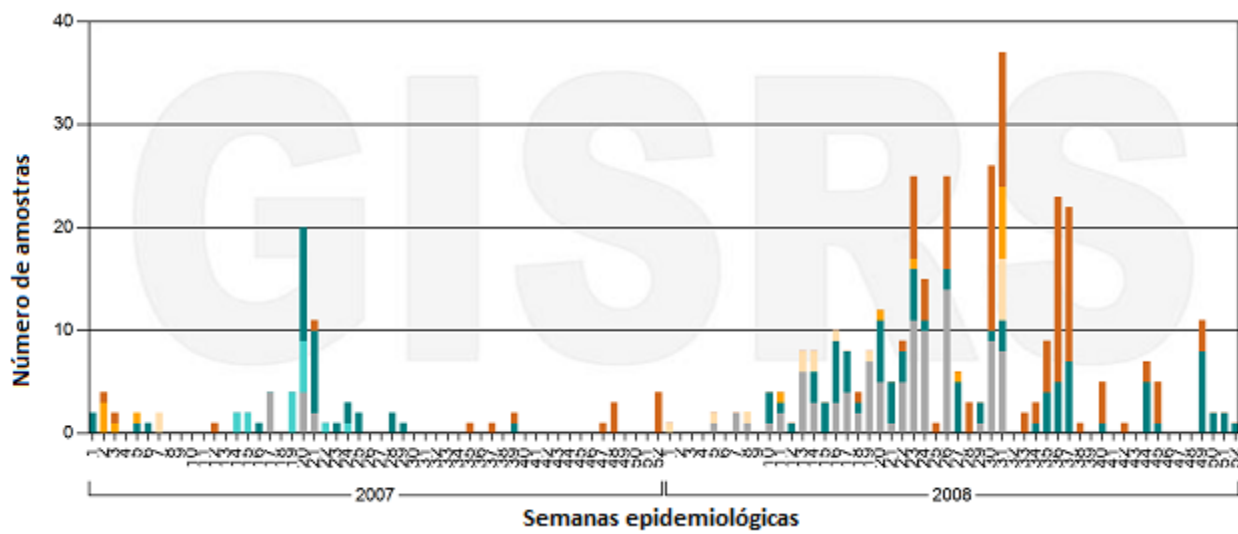
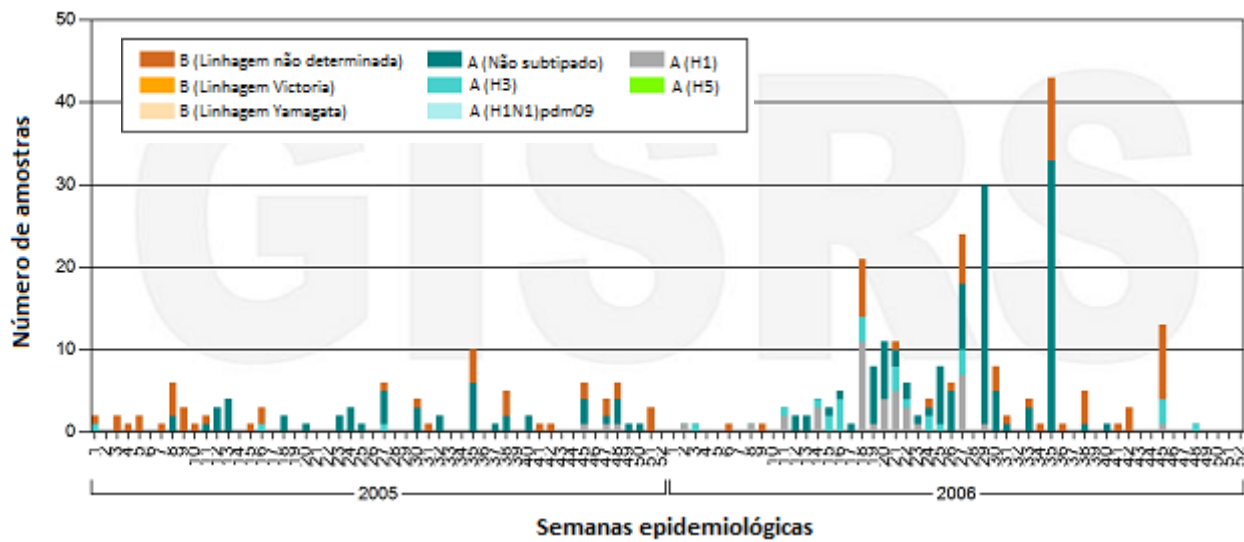
9.11. APÊNDICE E: Dados de número de diferenças entre os grupos. Foi considerado valores de distância menores do que 13 (valores destacados com cor), e para efeitos de comparação os menores valores (valores marcados com cor e borda), para estimar a divergência evolutiva entre os grupos classificados de acordo com os grupos antigênicos

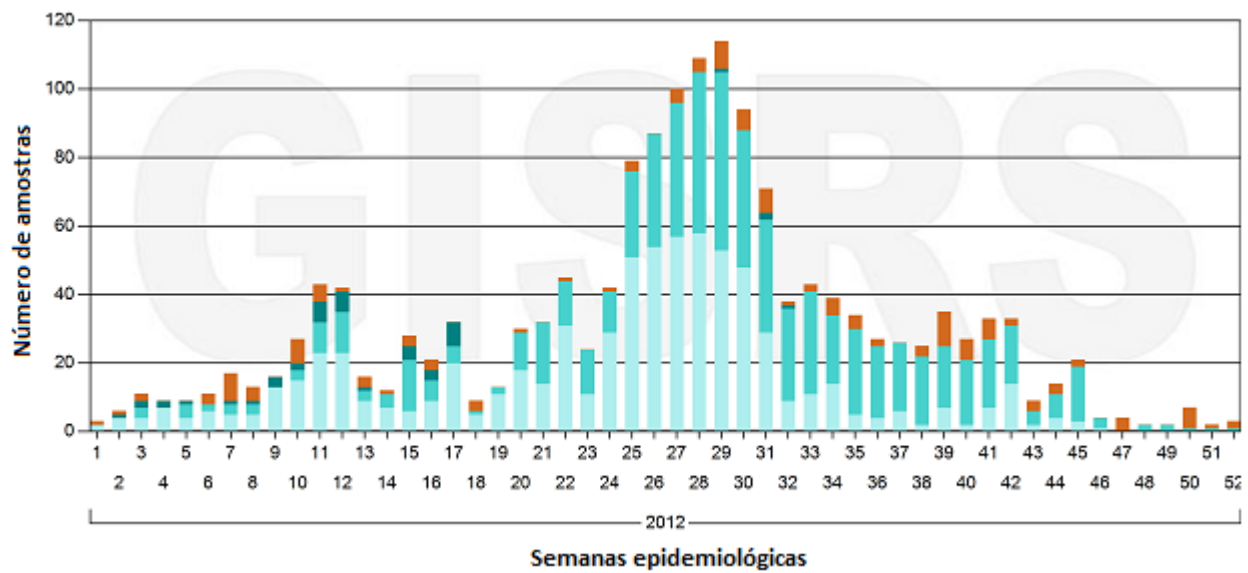
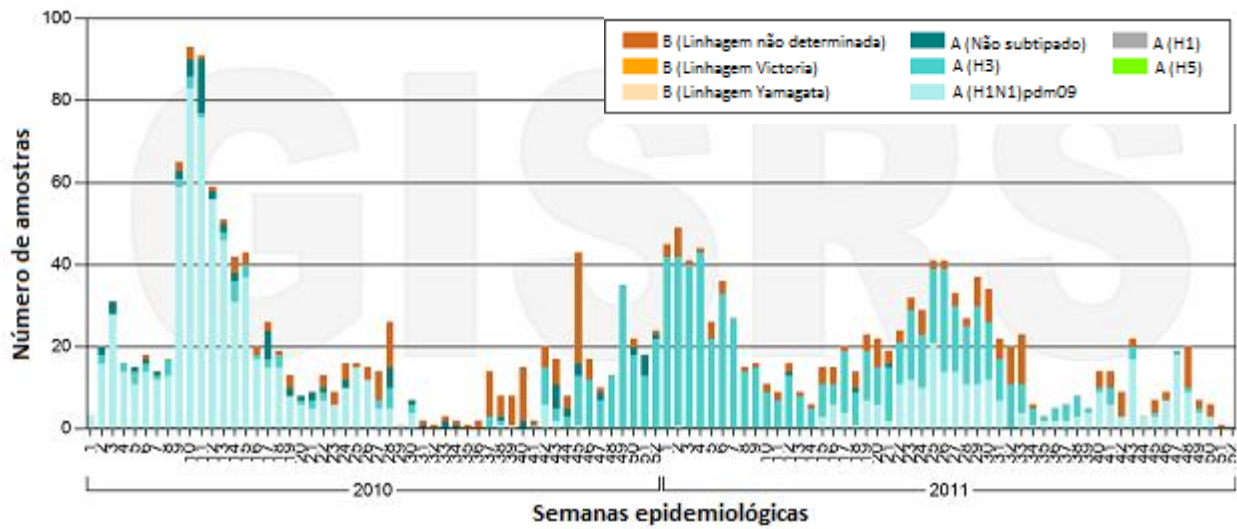
	SY97	MW99	PA99	FU02	CA04	WL04	WI05	BI07	PE09	VI11
SY97										
MW99	12,000									
PA99	11,400	10,650								
FU02	18,091	17,091	10,636							
CA04	23,000	22,000	17,150	10,000						
WL04	20,730	19,892	14,161	6,875	5,351					
WI05	24,000	24,000	18,200	11,818	6,000	7,189				
BI07	22,685	22,630	16,858	11,413	7,781	7,077	5,753			
PE09	26,833	25,833	21,336	16,328	13,833	12,968	10,389	7,275		
VI11	25,202	24,393	19,487	14,009	11,417	10,702	9,393	4,775	5,522	
BRASIL	12,769	15,000	16,869	22,902	26,000	25,012	27,462	26,611	29,868	28,315

SY97, A/Sydney/5/1997-like; MW99, A/Moscow/10/1999-like; PA99, A/Panama/2007/1999-like; FU02, A/Fujian/411/2002-like; CA04, A/California/7/2004-like; WL04, A/Wellington/01/2004-like; WI05, A/Wisconsin/67/2005-like; BI07, A/Brisbane/10/2007-like; PE09, A/Perth/16/2009-like; VI11, A/Victoria/361/2011-like.

9.12. APÊNDICE F: Número de amostras positivas por subtipo de influenza durante o período de 1999 a 2012 no Brasil







Dados gerados e adaptados de FluNet/OMS