

PATRICIA EVELIN SILVA

Detecção e análise filogenética do *Bocavírus humano* em crianças com infecção respiratória aguda no ano de 2010 em São Paulo, Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel de Oliveira

SÃO PAULO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Patricia Evelin.

Detecção e análise filogenética do *Bocavírus humano* em crianças com infecção respiratória aguda no ano de 2010 em São Paulo, Brasil. / Patricia Evelin Silva. – 2017.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Maria Isabel de Oliveira.

1. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 2. Bocavirus humano. 3. Virologia. 4. Criança. 5. Infecções respiratórias 6. Técnicas de Laboratório Clínico.

SES/CCD/CD-347/2017

DEDICATÓRIA

À minha filha Nathaly

Aos meus pais Irineu e Maria

À minha orientadora Dra. Maria Isabel de Oliveira

Agradecimentos

Agradeço a Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado concedida e ao Instituto Adolfo Lutz, por oferecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desta Dissertação.

Agradeço a Dra. Maria Isabel de Oliveira pela confiança depositada em mim, pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos Colegas do Núcleo de Doenças Respiratórias Dra. Ana Maria Afonso Sardinha, Dra. Suely Pires Curti, Dra. Terezinha Paiva, Margarete Benega pela participação no desenvolvimento deste trabalho.

In Memória a Dra. Cristina Adelaide Figueiredo que foi fundamental para meu ingresso no mestrado e por todo o apoio.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo permanente.

A equipe de trabalho do Núcleo de Doenças Respiratórias pelo carinho, convívio, colaboração e amizade.

A todos os funcionários do Centro de Virologia, que de forma direta ou indireta me auxiliaram.

Aos meus amigos principalmente Tamiris Fernanda Barbosa por aturar minhas reclamações, mau humor e incentivar a sempre continuar.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que colaboraram para a minha formação científica.

Resumo

Deteccão e análise filogenética do bocavírus humano em crianças com infecção respiratória aguda no ano de 2010 em São Paulo, Brasil.

O bocavírus humano (HBoV), gênero *Bocavírus*, família *Parvoviridae* está relacionado a doenças respiratórias, predominantemente na infância. Recebeu esta nomenclatura, devido a estrutura genômica apresentar similaridade aos gêneros parvovírus bovino e canino. Foram detectados 4 grupos: HBoV-1, HBoV-2, HBoV-3 e HBoV-4. Foi realizado um estudo retrospectivo, no ano de 2010, utilizando-se 300 amostras de secreção nasofaringe, coletadas de crianças de 0 a 5 anos de idade, com sintomas respiratórios agudo. As amostras foram registradas e processadas no Núcleo de Doenças Respiratórias do Instituto Adolfo Lutz. O objetivo foi detectar o vírus HboV e caracterizar filogeneticamente as cepas de HboV, nestas amostras e comparar com as sequencias depositadas no GenBank. Das 300 amostras analisadas através do teste de PCR em tempo real, 49 amostras (15,75%) foram positivas para HBoV. Todas estas amostras foram processadas por PCR, para a região do gene da VP1/VP2 do Bocavírus. Foram amplificadas 12 amostras e sequenciadas. As sequências de nucleotídeos obtidas em nosso estudo, foram comparadas com as sequências do Banco de gene e identificadas como do grupo HBoV 1. Os resultados mostraram que a ocorrência do HBoV é um fator importante, para a realização do diagnóstico diferencial que pode se manifestar associado, ou como visto neste estudo, como único agente causador da infecção. Este agravo é um fator que possibilita estabelecer medidas de controle para a vigilância epidemiológica, no auxilio clinico para a conduta no tratamento da doença. Estaremos introduzindo, no laboratório do Instituto Adolfo Lutz, a metodologia para identificação deste agente, para melhor atender à comunidade e a pesquisa científica. A caracterização molecular demonstrou ser do grupo HBoV1 que está circulando na da cidade de São Paulo o que poderá contribuir, para outros estudos na vigilância molecular desse vírus.

Palavras chave: bocavirus humano, diagnostico do HBoV, caracterização molecular, PCR em tempo real.

Abstract

Detection and phylogenetic analysis of human bocavirus in children with acute respiratory infection in the year 2010 in São Paulo, Brazil.

The human bocavirus (HBoV) genus *Bocavirus* Parvoviridae Family relates predominantly respiratory diseases in childhood. Received this nomenclature due to genomic structure present similarities to bovine and canine Parvovirus genres. Four groups were detected: HBoV-1, HBoV-2, HBoV-3 and HBoV-4. A retrospective study was carried out in the year 2010 using 300 nasopharyngeal secretion samples collected from children from 0 to 5 years of age with acute respiratory symptoms. The samples were recorded and processed in Respiratory Disease Center of the Adolfo Lutz Institute. Our goal was to detect the virus HboV and characterize HboV strains phylogenetically, in these samples and compare with the sequences deposited in GenBank. Of the 300 samples analysed by testing real-time PCR, 49 (15.75%) samples were positive for HBoV. All these samples were processed by PCR for gene region of VP1/VP2 of *Bocavirus*. 12 samples were amplified and sequenced. The nucleotide sequences obtained in our study were compared with the sequences of the gene Bank and identified as HBoV Group 1. The results showed that the occurrence of HBoV is an important factor for the differential diagnosis that can manifest associated or as seen in this study as single causative agent of infection. This interlocutory appeal is a factor that makes it possible to establish control measures for epidemiological surveillance in clinical assistance for conduct in the treatment of the disease. Clinical assistance in conduct for the treatment of the disease. We will be introducing in the Instituto Adolfo Lutz Laboratory methodology for identification of this agent to better serve the community and scientific research. The molecular characterization proved to be HBoV1 group that is circulating in the city of São Paulo which may contribute to other studies on molecular surveillance of this virus.

Key words: human bocavirus, diagnosis of HBoV, molecular characterization, real-time PCR.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAV2 – Adenovírus Associados 2

ADV - Adenovírus

ANS – Aspirado de Nasofaringe

BHQ1 – “Blackhole Quencher 1”

BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”

BoNP1 –Gene da Nucleoproteína 1 do Bocavirus

BoNS1 –Gene da proteína não estrutural1 do Bocavirus

BPV – Parvovírus bovino

BRSP – Brasil/São Paulo

°C – Graus Celsius

CDC – “Center for Disease Control and Prevention”

CoV – Coronavírus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Enzima que degrada DNA

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

FAM – 6-carboxifluoresceína

FLU – Influenza

FRET – Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência

g – Gramas

GenBank – Banco de Genes

GBoV – Gorila bocavírus

HBoV – Bocavírus Humano

hMPV – Metapneumovírus

HRV – Rinovírus humano

HRSV – Vírus Respiratório Sincicial Humano

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INF- β – Interferon β

IRA – Infecção do Trato Respiratório

IRTA – Infecção do Trato Respiratório

IVAS – Infecção das Vias Aéreas Superiores

kb – kilobyte

LFNs – Lavados Nasofaríngeos

mg/mL – Miligramas por microlitros

min – Minutos

mL – Mililitros

MVC – Minutovirus canino

NCBI – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

ng – nanogramas

ng/ μ L – nanogramas por microlitros

NIHC – National Institute of Health

nM – nanômetro

NP1 – Gene que expressa nucleoproteína 1

NP2 – Gene que expressa nucleoproteína 2

NS1 – Gene que expressa a proteína não estrutural 1

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORFs – “Open Reading Frame” (regiões de início de leitura)

PBoV – Bocavírus porcino

PBS – Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pb – Pares de Base

PIV – Vírus da Parainfluenza

PM – Padrão de peso Molecular

pMol – picoMol

qPCR – PCR quantitativo

R² – Coeficiente de correlação

RNA – Ácido ribonucleico

RNase – Enzima que degrada RNA

ROX – Corante de Referencia Passiva

rRNA – RNA ribossomal

Seg – Segundos

ST1 – Estocolmo 1

ST2 – Estocolmo 2

TA – Temperatura Ambiente

TaqMan® – Enzima participante na amplificação do DNA(Registro do fabricante)

TBE – TRI-BORATO + EDTA

TET – Tetracloro fluoresceína

tRNA – RNA de transferência

U – Unidade de medida de massa atômica

volts – Medida de voltagem

VP1 – Gene que expressa proteína

VP2 – Gene que expressa proteína

VRS – Vírus Respiratório Sincicial

µg – Microgramas

µg/mL – Microgramas por mililitros

µL – Microlitros

ΔRn – Incremento de sinal de fluorescência

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Relação dos <i>primers</i> e sondas utilizados na reação de PCR em Tempo Real da região do gene NP1/NS1.....	40
Tabela 2 – Controle endógeno do gene alvo RNase P humana	40
Tabela 3 – Relação dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR para sequenciamento.....	41
Tabela 4 – Distribuição das amostras positivas por Região na cidade de São Paulo.....	44
Tabela 5 – Identificação dos pacientes positivos por PCR Tempo-Real e Sequenciamento	45
Tabela 6 – Identificação dos casos que foram sequenciados	49

Lista de Figuras

Figura 1 – Classificação morfológica da Família <i>Parvoviridae</i>	23
Figura 2- Foto de microscopia eletrônica do HBoV	24
Figura 3 – Representação esquemática do genoma dos vírus HBoV1, HBoV2, HBoV3.....	25
Figura 4 – Reconstrução em 3D do capsídeo icosaédrico do Bocavírus.	26
Figura 5 – Fluxograma do Diagnóstico Laboratorial.....	38
Figura 6 – Distribuição da faixa etária dos casos positivos do Bocavírus.....	46
Figura 7 – Distribuição dos casos positivos em relação sintomas.....	47
Figura 8 – Curva de concentração do resultado de PCR em Tempo-Real.....	48

Figura 9 – Detecção do produto da PCR em gel de agarose.....48

Figura 10 – Sequências editadas.....50

Figura 11 – Árvore filogenética51

Figura 12 – Quadro de Similaridade e Divergência entre as sequências
.....52

Índice

1. Introdução	19
1.1 Histórico	20
1.2 Taxonomia	22
1.3 Organização Genômica	24
1.4 Replicação do HBoV	27
1.5 Epidemiologia	28
1.6 Distribuição Sazonal	29
1.7 Patogenicidade do HBoV	30
1.8 Infecções Respiratórias	30
1.9 Infecções Gastrointestinais	32
1.10 Diagnóstico Laboratorial	32
1.11 Biologia Molecular	33
1.11.1 Mecanismo do Real-Time qRT-PCR	33
1.11.2 Sequenciamento.....	34
2. Objetivos	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3. Materiais e Métodos	37
3.1 Casuística	37
3.2 Aspectos Éticos	38
3.3 Métodos	38
3.3.1 Imunofluorescência Indireta	38
3.3.2 Diagnóstico Laboratorial por PCR	39

3.3.2.1	Extração do Ácido Nucléicos das Amostras Clínicas	39
3.3.2.2	PCR Tempo-Real	39
3.3.2.3	Validação dos Ensaios de PCR em Tempo-Real e PCR Convencional	41
3.3.2.4	Aplicação do DNA Vital por PCR Convencional para Verificação das Bandas para Sequenciamento	40
3.3.2.5	Análise dos Produtos Amplificados	42
3.3.2.6	Purificação do Produto Amplificado	42
3.3.2.7	Sequenciamento do Gene VP1/VP2	43
3.3.2.8	Processamento e Alinhamento das Sequências dos genes	43
3.3.2.9	Análise Filogenética	43
4.	Resultados	44
4.1	Imunofluorescência Indireta	44
4.2	PCR em Tempo-Real para detecção do bocavírus	44
4.2.1	Validação dos Ensaios de PCR em Tempo-Real	47
4.3	Resultado do PCR Convencional para Sequenciamento	48
4.4	Resultado do Sequenciamento	49
5.	Discussão	53
6.	Conclusão	57
7.	Referências	58
8.	Anexos	65
9.	Apêndice	67

1. Introdução

O avanço em métodos moleculares permitiu a identificação de diferentes patógenos respiratórios, incluindo o metapneumovírus humano (hMPV), coronavírus (CoV), poliomavírus e do bocavírus humano (HBoV). Embora as doenças causadas por vírus respiratórios, no passado, tenham sido subestimadas, no presente momento o papel que estes vírus desempenham na comunidade e principalmente, em infecções intra-hospitalares ganharam importância, devido as grandes pandemias de Influenza (CHIEOCHANSIN et al., 2009; NESKE et al., 2007).

Em 2005, na Suécia foi identificado um novo vírus em lavados nasofaríngeos (LFNs) de crianças suecas que apresentavam sintomas de infecção do trato respiratório (IRTA), mas que não tinham nenhum agente etiológico conhecido detectável. Desde a sua descoberta tem sido associado a infecções respiratórias e gastrointestinais, principalmente em crianças (ALLANDER et al., 2005).

O HBoV pertence a família Parvoviridae (parvovírus), subfamília Parvovirinae, gênero Bocavírus. Os membros do gênero bocavírus, anteriormente descritos são os parvovírus bovino (BPV) e o minutovírus canino (MVC), portanto, o HBoV é o primeiro do gênero Bocavírus associado a infecções em humanos (ALLANDER et al., 2005).

Como os demais parvovírus, possui uma fita simples de DNA não envelopado, seu capsídeo tem formato icosaédrico, o genoma é formado por duas janelas de leitura (ORFs) principais codificam uma proteína não estrutural chamada NS1 e duas proteínas de capsídeo chamadas VP1 e VP2 (BERNS e PARRICH, 2007).

O bocavírus vem sendo detectado em várias regiões do mundo, com frequência que varia entre 1,5% a 19% dependendo da faixa etária e das características clínicas dos pacientes analisados. A alta frequência de co-infecções com outros vírus respiratórios conhecidos como HRSV, HRV e FLU soma-se a ausência de modelos animais e evidências experimentais, para pôr em associação (ALLANDER, 2008; ARTHUR et al., 2009; KAPOOR et al.,

2014; WEISSBRICH et al., 2006, SCHILDGEN et al., 2008). Pouco se sabe sobre a biologia desse vírus, incluindo sua variabilidade, rotas de transmissão, sítios replicativos e mecanismos de patogenicidade (ARTHUR et al., 2009; KAPOOR et al., 2014). No Brasil existem poucos estudos sobre a presença desse vírus no trato respiratório. Por isso a importância na realização deste estudo no Estado de São Paulo (SANTOS et al., 2010; DURIGON et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Com a pandemia do vírus da gripe ocorrida em 2009, se fez necessário a realização de estudos para detecção de outros agentes infecciosos envolvidos no quadro de doença respiratória aguda cuja etiologia não foi compatível com o vírus da gripe, influenza A (H1N1). Estaremos introduzindo o diagnóstico diferencial através de estudo retrospectivo com amostras de pacientes coletadas no ano de 2010, nas quais não detectou-se o agente causador da infecção do trato respiratório, pela utilização do painel de vírus respiratórios.

O Instituto Adolfo Lutz caracteriza-se pela prestação de Serviço Público e Pesquisa, estaremos introduzindo a metodologia para identificação deste agente para melhor atender à comunidade e a pesquisa científica.

1.1. Histórico

Bocavírus humano (HBoV) foi descrito pela primeira vez em 2005, detectado predominantemente em pacientes com comprometimento no trato respiratório. Os pesquisadores realizaram uma amplificação randômica do material genético seguida de análise de bioinformática. Foram utilizados dois conjuntos de amostras de aspirados de nasofaringe (ANS), provenientes de amostras selecionadas aleatoriamente. Ambos foram submetidos a ultracentrifugação, microfiltração e tratamento com DNase. O material genético encapsulado foi extraído, amplificado, clonado e sequenciado (ALLANDER et al., 2005).

A análise de aminoácidos mostrou que estas duas sequências eram similares ao BPV e o MVC sendo denominadas Estocolmo 1 e 2 (ST1 e ST2). Foram construídas árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos dos

isolados ST1 e ST2 e os vírus da subfamília *Parvovirinae*, os resultados das sequências de nucleotídeos e aminoácidos das duas maiores ORF confirmaram que os isolados se agrupavam com o BPV e o MVC. Este estudo levou a conclusão de que se tratava de um novo parvovírus e devido a sua relação próxima ao parvovírus bovino e ao minuto vírus canino foi denominado de Bocavírus Humano. A variabilidade genética do HBoV é baixa e estudos filogenéticos indicam que dois genótipos circulam paralelamente ao redor do mundo (ALLANDER et al., 2005; ALLANDER, 2008).

Para confirmar a associação do *bocavírus* como um novo agente etiológico de infecção respiratória em humanos, os pesquisadores analisaram 540 amostras de aspirado de nasofaringe de pacientes hospitalizados com quadro respiratório, onde, 3,1% das amostras foram positivas para HBoV. Das amostras positivas 82% foram positivas somente para o HBoV enquanto, os 18% restantes foram positivas para HBoV e mais algum outro agente etiológico causador de infecção respiratória como o Adenovírus e o RSV (*vírus respiratório sincicial*) mostrando uma presença significativa do HBoV em co-infecções no trato respiratório (ALLANDER et al, 2005; ALLANDER, 2008).

Além disso, todos os pacientes apresentavam sintomas respiratórios por um período de um a quatro dias, sintomas esses de graus variados, compatível com bronquite, asma, febre, infiltrados pulmonares e pneumonia. Essas pacientes se enquadram em uma faixa etária entre 5 meses a 5 anos de idade (ALLANDER et al., 2005, ALLANDER, 2008).

Desde a sua descoberta por Allander e seus colaboradores em 2005, o Bocavírus tem sido incessantemente estudado ao redor do mundo como potencial causa de doenças respiratórias e entéricas em humanos, principalmente em crianças (ALLANDER, 2008).

Existem estudos que sugerem que o HBoV-1 divergiu do bocavírus do chimpanzé a cerca de 60 a 80 anos atrás e o HBoV-4 divergiu separadamente de grandes símios a aproximadamente 200 a 300 anos atrás. Derivando desta hipótese pesquisadores estão estudando a hipótese de que os genótipos 2 e 3 originaram-se da recombinação dos dois genótipos citados anteriormente

(CHIEOCHANSIN et al., 2009; TYUMENTSEV et al., 2014; CHENG et al., 2011; FU X et al., 2011).

Após a descoberta do HBoV-1, o HBoV-2 foi descrito pela primeira vez em janeiro de 2009 por Kapoor e seus colaboradores sendo detectado em amostras de fezes de pacientes com infecções entéricas, sua análise filogenética mostrou 78%, 67% e 80% de similaridade de aminoácidos com as proteínas NS1, NP1 e NP1/NP2 do HBoV-1 respectivamente (KAPOOR et al., 2014; KAPOOR et al., 2009).

O HBoV-3 foi descrito pela primeira vez por Arthur e seus colaboradores em abril de 2009 na Austrália, seu genoma quando analisado demonstrou que alta similaridade na região codificadora das proteínas não-estruturais (NS1, NP1) do HBoV-1, já na região que codifica proteínas estruturais (VP1/VP2) a similaridade é maior com o HBoV-2, indicando que o HBoV-3 pode ser um produto da recombinação entre o HBoV-1 e o HBoV-2 e está hipótese foi fortalecida pela descoberta de um possível sítio de recombinação (ARTHUR et al., 2009).

O HBoV-4 foi identificado em amostras de fezes e possui baixa incidência, não passando de 2%, descrito por Arthur e seus colaboradores há poucos relatos sobre ele na literatura embora ele tenha sido amplamente estudado (ARTHUR et al., 2009).

1.2 Taxonomia

O HBoV é um membro da família *Parvoviridae* (subfamília *Parvovirinae*, gênero *Bocavirus*), demonstrado na figura 1. Até a sua identificação, o único patógeno humano desta família era o parvovírus humano B19. O HBoV recebeu esta nomenclatura devido a estrutura genômica apresentar similaridade aos gêneros parvovírus bovino e canino. Os membros do gênero bocavírus conhecidos até o momento são: parvovírus bovino (BPV), canino minuto vírus (MVC), bocavírus porcino (PBoV), gorila bocavírus (GBoV) e o bocavírus humano (HBoV), sendo que os recentes isolados de gorila e porco

são geneticamente bem próximos ao humano (ALLANDER et al., 2005; ALLANDER, 2008; ALLANDER et al., 2007).

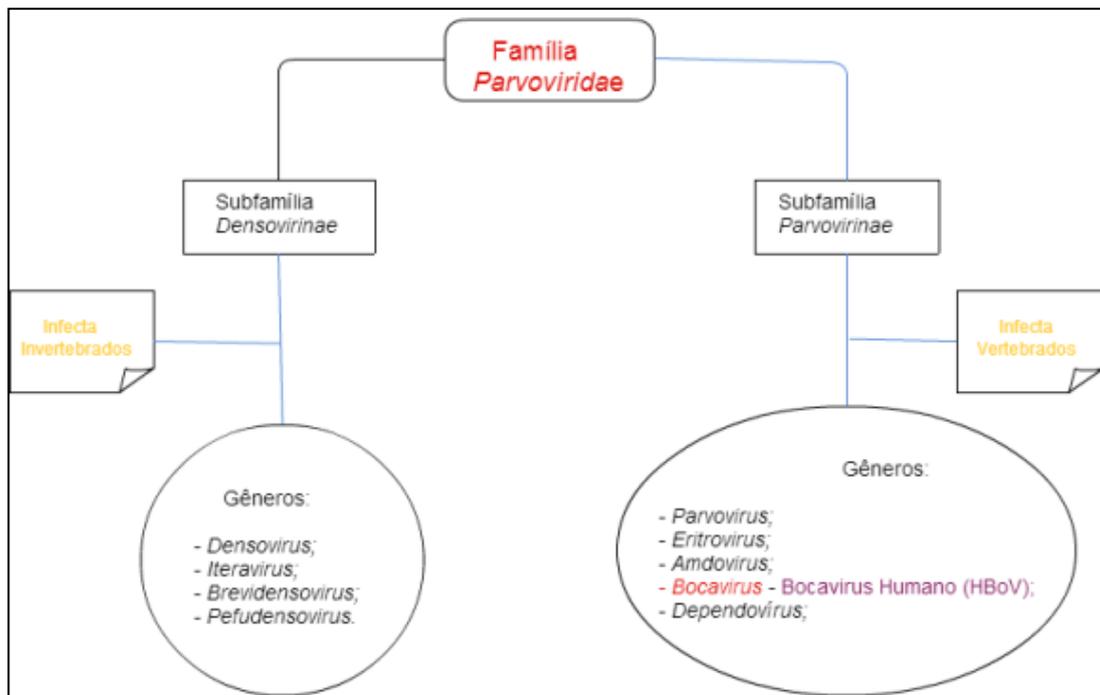


Figura 1- Classificação morfológica da Família *Parvoviridae*. Adaptado de Fields virology.

Os membros da família Parvoviridae são vírus pequenos e não envelopados. Apresentam nucleocapsídeo com diâmetro entre 18 a 26 nm que contém uma simples de DNA. Os parvovírus, possuem capsídeo icosaédrico com pequenas protuberâncias e grandes depressões circundando o eixo central, que são admitidas como sendo essenciais para a sua biologia como demonstrado na figura 2. Estima-se que elas atuem como determinantes de tropismo no hospedeiro, ligantes de receptores e importantes sítios de ligação de anticorpos, como também para o desenvolvimento de inibidores estruturais específicos (BERNS e PARRISH, 2007; VICENT et al. 2007).

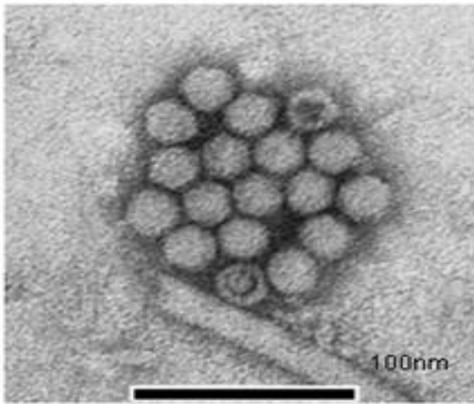


Figura 2- Foto de microscopia eletrônica do HBV. Fonte: Gruda et al, 2010

1.3 Organização Genômica

O genoma completo apresenta aproximadamente entre 4000 a 6000 nucleotídeos e contém três quadros de leitura abertos (ORF- *Open Reading Frames*) que codificam duas proteínas não estruturais (NS1 e NP1) e duas proteínas do capsídeo vil (VP1 e VP2). Acredita-se que a proteína NS1 apresente papel importante na replicação viral. A heterogeneidade gênica das regiões VP1 e VP2 é bem maior do que as regiões NP1 e NP2, sendo as duas primeiras preferidas para as análises filogenéticas do vírus (ALLANDER, 2008, SCHILDGEN, et al., 2008). A comparação do produto da ORF central do HBV com as dos outros dois vírus do gênero mostrou 47% similaridade, reforçando a classificação do HBV como Bocavírus. Na figura 3 é possível a visualização do genoma do gênero Bocavírus (ARTHUR et al., 2009, KAPOOR et al., 2009, SANTOS et al., 2010).

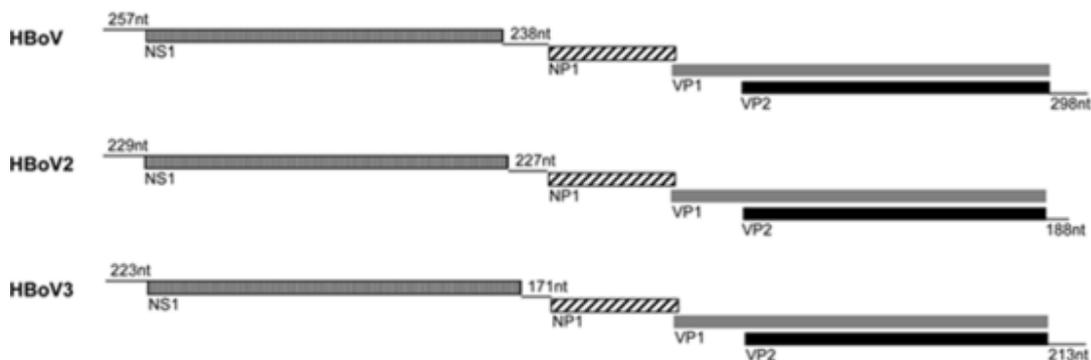


Figura 3: Representação esquemática do genoma dos HBoV 1, HBoV 2 e HBoV 3, mostrando a sequência e a posição de leitura para os genes NS1, NP1, VP1 e VP2. Pode-se observar que tanto para o HBoV 1 quanto para os outros o gene NP1 se sobrepõe ao início do gene VP1 por 13 nucleotídeos e a sequência de leitura do gene VP2 está contida na sequência de leitura do gene VP1. Fonte: Arthur 2009.

As análises filogenéticas do HBoV têm demonstrado que o genoma desse vírus é altamente conservado, com uma identidade de aproximadamente 98%. A maior variação ocorre nas regiões codificadoras de VP1 e VP2, possuindo identidade de 98,7% e 98,2% respectivamente. As regiões responsáveis pela transcrição da NS1 e da NP1 são mais conservadas com identidade de 99,4% e 99,2% respectivamente (SCHILDGEN et al., 2008; CHIEOCHANSIN et al., 2009, FU X et al., 2011).

Em um estudo realizado em 2007 por Neske et al., foram analisadas 968bp do gene VP2 de 69 amostras positivas para HBoV e observaram que as variações ocorreram em apenas 34 posições (3,5%) das 968 analisadas. As transições (mutação onde uma purina é substituída por outra purina ou pirimidina é substituída por outra pirimidina ou vice-versa) representaram 7% das variações. Além disso, a maioria das mutações que ocorreram no gene VP2 eram conservativa. A identidade no nível de aminoácidos foi de 99,7% (NESKE et al, 2007).

Embora essa variação pareça extremamente baixa, vale destacar que devido ao seu pequeno genoma, essas pequenas mutações podem causar mudanças drásticas na biologia do vírus, além do fato de seu DNA ser de fita simples e sua replicação é processada pela DNA polimerase da célula hospedeira (que possui sistema de reparo dependente da dupla fita de DNA)

tornando-o teoricamente mais susceptível a modificações em curto período de tempo (TYUMENTSEV et al., 2014; CHENG et al., 2011; FU X et al., 2011).

Tem-se levantado várias hipóteses e realizado vários estudos com relação a recombinação genômica do HBoV, o que foi descoberto recentemente é que o subtipo HBoV3 é uma recombinação entre o HBoV1 e o HBoV2 e que este último possui o genoma circular levantando a questão sobre o porquê as estruturas são diferentes entre os subtipos (TYUMENTSEV et al., 2014; CHENG et al., 2011; FU X et al., 2011).

Um estudo de crioreconstrução realizado em 2010 demonstrou que o vírus possui o núcleo altamente conservado. Essa conservação dos principais aspectos estruturais dos parvovírus é coerente com as funções essenciais de montagem e estabilidade do capsídeo viral (GURDA et al., 2010). A conservação dos principais aspectos estruturais dos parvovírus é coerente com as funções essenciais de montagem e estabilidade do capsídeo. De maneira geral, o HBoV partilha a maioria das características de superfície do capsídeo com os demais parvovírus humanos, o B19 e o adenovírus associado 2 (AAV2), o que resulta em uma morfologia de capsídeo única como pode-se observar na Figura 4 (GURDA et al., 2010).

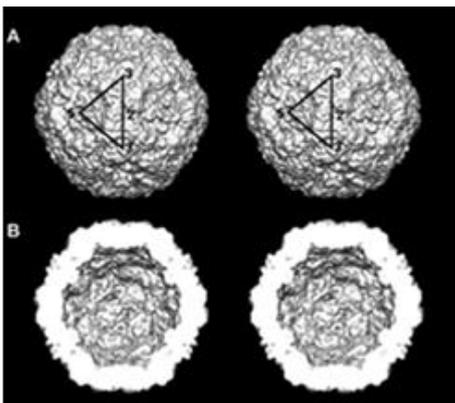


Figura 4: reconstrução em 3d do capsídeo icosaédrico do bocavírus. Fonte: Gurda, 2010.

1.4 Replicação de HBoV

O ciclo do HBoV e os mecanismos de replicação do seu genoma ainda não foram descritos. O que se conhece foi descoberto estudando o ciclo replicativo de outro parvovírus (BERNS K.; PARRISH CR. 2007). No geral, os parvovírus se ligam a um ou mais receptores presentes na membrana da célula hospedeira e entram por endocitose. A seguir são liberados no citoplasma, onde, por um processo dependente do citoesqueleto eles são transportados para a periferia nuclear, onde se dá a entrada no núcleo por um processo ativo. No núcleo, esses vírus são desmontados e ocorre a replicação do DNA viral por uma DNA polimerase celular (BERNS e PARRISH, 2007).

Diversos receptores já foram descritos para vários membros da família Parvoviridae. Porém, nenhum receptor de HBoV, nem seus sítios de replicação no homem foram ainda descritos. As funções das proteínas do HBoV ainda não foram completamente elucidadas por causa da dificuldade de se isolar o vírus em cultura celular ou em modelo animal (VICENT et al., 2007). Sendo que recentemente Djkman e seus colaboradores desenvolveram um sistema de cultura de células para o HBoV utilizando células epiteliais diferenciadas das vias respiratórias humana (BERNS e PARRISH, 2007; DJKMAN et al., 2009).

A replicação do HBoV ocorre dentro do núcleo da célula hospedeira e a proteína NP1 que é exclusiva do gênero bocavírus possui um papel importante na replicação viral que ainda não foi totalmente esclarecida, supondo-se que seja semelhante aos outros vírus do gênero bocavírus e na inibição da produção de IFN- β (DJKMAN et al., 2009; ZHI et al. 2006). Sabe-se que o vírus causa perda da parte ciliar da célula epitelial e causa hipertrofia celular e também mata a célula hospedeira por apoptose ou necrose (CHOW, 2009; PROENÇA-MODENA, 2011).

Sabe-se que o HBoV tem tropismo por células que se replicam constantemente e de maneira eficiente como células dos sistemas respiratório e digestivo e também células precursoras de medula óssea. O vírus fica persistente, sem se replicar (ou fazendo-o a uma taxa baixíssima) por longos períodos no homem, do mesmo modo que outros parvovírus: parvovírus

humano B19, o parvovírus humano 4 e o AAV (CHOW, ESPER 2009). Além disso, o DNA viral já foi detectado em amostras respiratórias, de fezes, urina, soro, saliva, fecal e tecidos linfáticos (ARTHUR et al., 2009; PROENÇA-MODENA, 2011; MANNING et al., 2006).

Outros estudos realizados mostram que pacientes com elevada carga viral também apresentavam viremia e uma expressiva resposta imune ao vírus com 73% de IgG e 49% de IgM, também demonstraram que a maioria dos adultos são soropositivos para HBoV indicando uma possível exposição na infância (KANTOLA et al., 2008; KESEBIR et al., 2006).

1.5 Epidemiologia

O HBoV foi detectado ao redor do mundo, desde a sua descoberta na Suécia (ALLANDER et al., 2005) e posteriormente na Inglaterra, China, Coréia do Sul, Alemanha, Japão, Suécia, Austrália, Canadá, Estados Unidos, África do Sul, França, Irã, Jordânia, Holanda e no Brasil em amostras fecais (ALBUQUERQUE et al., 2009) e respiratórias (GAGLIARDI et al., 2009). A maioria dos estudos foi realizada em amostras de secreção do trato respiratório e alguns em fezes de pacientes, sendo a maior parte das crianças com IRTA (ALLANDER et al., 2005; ARTHUR et al., 2009; SCHILDGEN et al., 2008; DURIGON et al., 2010, CHOW e ESPER, 2009; MANNING et al., 2006; GAGLIARDI et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2009).

O vírus é detectado frequentemente em crianças menores de 2 anos de idade (ALLANDER et al., 2005) com alta prevalência em crianças de 6 meses a 2 anos (ALBUQUERQUE et al., 2009; KARALAR et al., 2009). Estes resultados mostram que a incidência de HBoV em crianças menores está relacionado com a diminuição dos anticorpos maternos, sugerindo que o HBoV é um vírus endêmico com altas taxas de contágio em crianças susceptíveis (KAI et al., 2010; BERRY et al., 2015).

A prevalência do HBoV diminui com o aumento da idade do paciente, entretanto, o vírus tem sido detectado em adultos e crianças imunossuprimidas,

sugerindo a possibilidade de latência viral (FOULONGNE et al., 2006; JARTTI et al., 2012, MA X et al., 2006).

A taxa de infecção em pacientes com doenças respiratórias agudas varia entre 1,5 a 19% e as taxas de co-infecções variam entre 35% a 90% segundo dados da literatura (MAGGI et al., 2007; SMUTS e HARDIE 2005; FRY et al., 2007; KAPLAN et al., 2006; ARDENK et al., 2006).

Em estudos realizados no Brasil, a taxa de ocorrência do HBoV 1 varia entre 6,1% a 13%, em amostras respiratórias de crianças de até 12 anos de idade, confirmando assim, a alta taxa de infecção em crianças principalmente entre 6 meses e 2 anos (CHOI et al., 2008; FRY et al., 2007; MA X et al., 2006; ARNOLD et al., 2006; POZO et al., 2007; BIN et al., 2013; TABASI et al., 2016).

1.6 Distribuição Sazonal

Diversos estudos relatam a sazonalidade do HBoV (CHOI, et al., 2008; ARNOLD, et al., 2006; POZO, et al., 2007; BIN, et al., 2013; TABASI, et al., 2016; XIAOYAN, et al., 2006) porém a análise em conjunto não indica ocorrência sazonal regular na infecção por este vírus e não levam em conta a possibilidade da presença assintomática o que alteraria as estimativas de prevalência. A maioria dos estudos realizados são de regiões de climas temperados e relatam ocorrência maior durante o inverno e a primavera (ALLANDER et al., 2005).

Na Coréia a ocorrência relatada é maior no final da primavera e começo do verão (CHOI et al., 2008). Por outro lado, crianças internadas com chiado e sintomas primários de infecção por HBoV forma detectados ao longo de todo o ano (ALLANDER et al. 2007). Para a determinação da sazonalidade são necessários mais estudos retrospectivos. No Brasil, um estudo estabeleceu um padrão sazonal para a ocorrência do HBoV, sendo um pico observado no outono.

1.7 Patogenicidade do HBoV

O HBoV é frequentemente encontrado em co-infecções com outros vírus, dificultando os estudos sobre a sua patogenicidade. Grande parte dessa dificuldade vem do fato que não é possível aplicar os postulados de Koch a HBoV, pois até agora não existe modelo para infecção por esse vírus e além disso, ele não se propaga em nenhuma linhagem celular pré-estabelecidas nos laboratórios de pesquisa ao redor do mundo (XIAOYAN et al., 2006).

Os estudos publicados até o momento relatam a frequência e geralmente a carga viral desses vírus em pacientes ao redor do mundo, sugerindo a existência de uma possível associação entre HBoV e as diversas patologias humanas. Ainda não se conhece as rotas de infecção, os sítios replicativo e os mecanismos patogênicos do HBoV. Acredita-se que a infecção aconteça por inalação, por inoculação alimentar ou pela via fecal-oral (ARTHUR et al., 2009).

Entretanto, ainda são necessários estudos para detalhar essas vias. Estudos mostram que 85% das crianças com mais de 2 anos de idade já tinham entrado em contato com HBoV e tem se tornado soropositivas para esse vírus (KESEBIR et al., 2006; FRY et al., 2007).

1.8 Infecções Respiratórias

O HBoV é frequentemente encontrado em amostras de pacientes com sintomas de infecção de trato respiratório (IRA). Porém, diversos fatores dificultam estabelecer a relação casual entre a presença de HBoV e os sintomas clínicos. Em primeiro lugar, o HBoV pode se manter persistentemente, sem se replicar ou fazendo-o a uma taxa baixíssima de vírus por longos períodos de tempo no homem, do mesmo modo como o parvovírus humano (ALLANDER et al., 2005; MANNING et al., 2006; TABASI et al., 2016). Além disso, o HBoV está sempre em associação com outros vírus respiratórios, como influenza A e B (Flu A e B), vírus respiratório sincicial (VRS) e rinovírus (HRV). Entretanto, estudos vêm mostrando evidências que o HBoV pode estar significativamente associado a doenças do trato respiratório superior e inferior,

principalmente em crianças (ALLANDER et al., 2008; KAPOOR et al., 2014; DURIGON et al., 2010; KAPOOR et al., 2009; ALLANDER, et al., 2007).

Estudos realizados por Manning et al., (2006) realizado com amostras respiratórias de 574 pacientes escoceses, detectou HBoV em aproximadamente 15% daqueles com sintomas de infecção do trato respiratório inferior, em 6% dos pacientes com sintomas do trato respiratório superior e em apenas 1% dos pacientes sem sintomas de infecção do trato respiratório.

Um importante estudo realizado pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC) e publicado por Fry et al., 2007, foram analisados 1.960 pacientes tailandeses. Desses, 1.168 tinham pneumonia adquirida na comunidade, 512 tinham sintomas de gripe e 280 não apresentavam sintomas de IRA. HBoV foi detectado em apenas 3 indivíduos assintomáticos (1%), mas foi detectado em 3,9% dos pacientes com sintomas de gripe e em 4,5% dos pacientes com pneumonia. Além disso, a prevalência de HBoV em crianças menores de 5 anos foi de 12% naquelas com pneumonia e de apenas 2% naquelas sem sintomas de IRA.

O HBoV foi o terceiro vírus mais frequentemente detectado em crianças com diagnóstico de pneumonia. Em relação ao papel das co-infecções na biologia do HBoV, muito pouco se sabe e mais estudos são necessários. Porém estudos de diversas partes do mundo mostram que a carga viral de HBoV é mais alta em pacientes com sintomas de IRA e sem nenhuma co-infecções (SANTOS et al., 2010; ALLANDER et al., 2007) sendo indício de associação de HBoV e doença respiratória em humanos. Os dados disponíveis indicam que uma carga viral alta e viremia por HBoV são associados com sintomas de infecção do trato respiratório, enquanto que a baixa carga viral associada a outros patógenos virais do trato respiratório, apontam para a possibilidade de persistência de HBoV no trato respiratório do homem (SANTOS et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

Os sintomas respiratórios mais frequentemente associados a infecção por HBoV são: chiado, crupe, tosse, rinorreia e febre (ALLANDER et al., 2005; SODERLUND-VENERMO et al., 2009). Entre os diagnósticos clínicos dos

pacientes com HBoV, os mais comuns têm sido: infecção das vias aéreas superiores (IVAS), bronquiolite, pneumonia, bronquite e exacerbação aguda de asma (WEISSBRICH et al., 2006; DURIGON et al., 2010; SODERLUND-VENERMO et al., 2009). Os sintomas em geral, duram de uma a duas semanas.

1.9 Infecções Gastrointestinais

Além de estar associado a sintomas do trato respiratório inferior e superior, o HBoV também foi encontrado no trato gastrointestinal de pacientes com gastroenterite com ou sem sintomas respiratórios (VICENTE et al., 2007). Arnald et al., em 2006 relataram que 16% dos casos positivos para HBoV em um hospital infantil apresentavam diarreia. Na Alemanha, um estudo identificou de 31 amostras do trato respiratório positivas para HBoV, 45 de amostras fecais positivas para HBoV. Arthur et al., 2009, encontram não só o HBoV, bem como HBoV2 e HBoV3, em amostras de pacientes internados com gastroenterite aguda (VICENTE et al., 2007; PROENÇA-MODENA, 2011).

1.10 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial de HBoV tem sido realizado predominantemente em lavados e swabs nasofaríngeos por métodos moleculares, baseados na metodologia de PCR, pois os métodos baseados em cultura viral, modelo animal e detecção de antígenos por anticorpos ainda não foram desenvolvidos (ALLANDER et al., 2007; VICENTE et al., 2007; ARTHUR et al., 2009). A região do genoma mais utilizada para o desenho de iniciadores para análise de diagnóstico é a que codifica o gene NP1, pois juntamente com o gene NS1, formam a região mais conservada do genoma. Para estudos de filogenia ou variabilidade genética, a região Vp1/VP2 é a escolhida, pois apresenta um alto grau de variabilidade (ALLANDER et al., 2005).

Atualmente, a reação de PCR em tempo real tem sido utilizada para a detecção e quantificação do HBoV. Além desses métodos, a Microscopia

Eletrônica pode ser usada para pesquisas sobre a estrutura do vírus, porém é um método mais demorado (BRIEU et al., 2007).

Em 2009, foram realizadas tentativas de aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico sorológico. Foram realizados imunoenaios enzimáticos de imunoglobulina IgG e IgM com partículas recombinantes “ vírus like” de HBoV como antígenos. Os ensaios apresentaram uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 99,5% nos diagnósticos (SODERLUND-VENERMO et al., 2009).

1.11 Biologia Molecular

1.11.1 Mecanismos do Real-Time qRT-PCR

Real-Time qPCR (PCR quantitativo em tempo real) é um importante desenvolvimento da tecnologia de PCR que permite a detecção e medição de produtos gerados durante cada ciclo do processo de PCR. Esta técnica tornou-se possível após a introdução de uma sonda oligonucleotídica, que foi concebido para hibridar no interior da sequência alvo. A clivagem da sonda durante a PCR por causa da atividade de nuclease 5' de Taq polimerase pode ser utilizado para detectar a amplificação específica do produto-alvo. A especificidade é conferida através de dois iniciadores de PCR e sonda. As sondas TaqMan são sondas de hidrólise que são concebidas para aumentar a especificidade da PCR quantitativa. O método foi relatado pela primeira vez em 1991 por pesquisadores da Cetus Corporation (SANAJAY E KRAMER, 1996).

O princípio sonda TaqMan baseia-se na atividade de exonuclease 5'-3' da Taq polimerase para clivar uma sonda duplamente marcada durante a hibridação para a detecção complementar da sequência alvo e a detecção baseada no fluoróforo (SANAJAY E KRAMER, 1996). Tal como em outros métodos de PCR quantitativos, o sinal da fluorescência resultante permite medições quantitativas da acumulação do produto durante as fases exponencial do PCR no entanto, a sonda TaqMan aumenta significativamente a especificidade da detecção.

As sondas TaqMan consistem de um fluoróforo covalentemente ligado à extremidade 5' do oligonucleótido sonda e um extintor “quencher” na extremidade-3' (SANAJAY E KRAMER, 1996). Vários fluoróforos diferentes (por exemplo, 6-carboxifluoresceína, sigla: FAM, ou tetracloro fluoresceína, sigla: TET) e supressores (por exemplo tetramethylrhodamine, sigla: TAMRA) estão disponíveis (SANAJAY E KRAMER, 1996) A molécula quencher extingue a fluorescência emitida pelo fluoróforo quando excitado por fonte do reciclador luz através de Transferência de Energia de Ressonância de fluorescência (FRET). (SANAJAY E KRAMER, 1996) enquanto o fluoróforo e o extintor são em proximidade, extinguindo inibe quaisquer sinais de fluorescência.

As sondas TaqMan hibridam dentro de uma região de DNA que é amplificado por um conjunto específico de iniciadores. Como a polimerase Taq estende o iniciador e sintetiza a cadeia simples, a partir de 3 'para 5' da cadeia complementar, a atividade de 5 'a 3' exonuclease da polimerase Taq degrada a sonda que tenha emparelhado com o molde. A degradação da sonda liberta o fluoróforo a partir dele e quebra a estreita proximidade com o inibidor, de modo a aliviar o efeito de extinção e permitindo a fluorescência do fluoróforo. Assim, a fluorescência detectada no termociclador de PCR quantitativa é diretamente proporcional ao fluororo libertado e a quantidade de DNA molde presente na PCR. (SANAJAY E KRAMER, 1996).

1. 11. 2 Sequenciamento

O método tradicional de sequenciamento de DNA consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxirribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela enzima TaqDNA polimerase após sua adição. Método de Sanger, que foi utilizado neste trabalho, uma fita simples de DNA será sequenciada, é hibridizada com um iniciador de desoxinucleotídeos marcado na ponta 5 (cinco linha). Quatro misturas de reação são preparadas onde os iniciadores utilizados serão alongados por uma DNA polimerase. Cada mistura contém os quatro desoxinucleosídeos trifosfato normais mais um dos quatro

didesoxinucleosídeos trifosfato em uma razão de aproximadamente 1/100. Uma vez que um didesoxinucleotídeo não tem ponta 3'-OH, não é possível haver alongamento da fita de DNA, a partir do nucleotídeo adicionado, parando a reação. Desta forma, cada mistura de reação produzirá cadeias prematuramente terminadas de acordo com toda ocorrência de um didesoxinucleotídeo adicionado. Cada mistura é então separada em um gel de sequenciamento por eletroforese para se detectar cada um dos nucleotídeos presentes na sequência de DNA lida.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a detecção e análise filogenética do HBoV em amostras de aspirados de nasofaringe de crianças com sintomas de doenças respiratórias com idade de 0 a 5 anos, no ano de 2010 na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os genótipos circulantes na região.
- Comparar o genótipo circulante com os já identificados e depositados no GenBank.

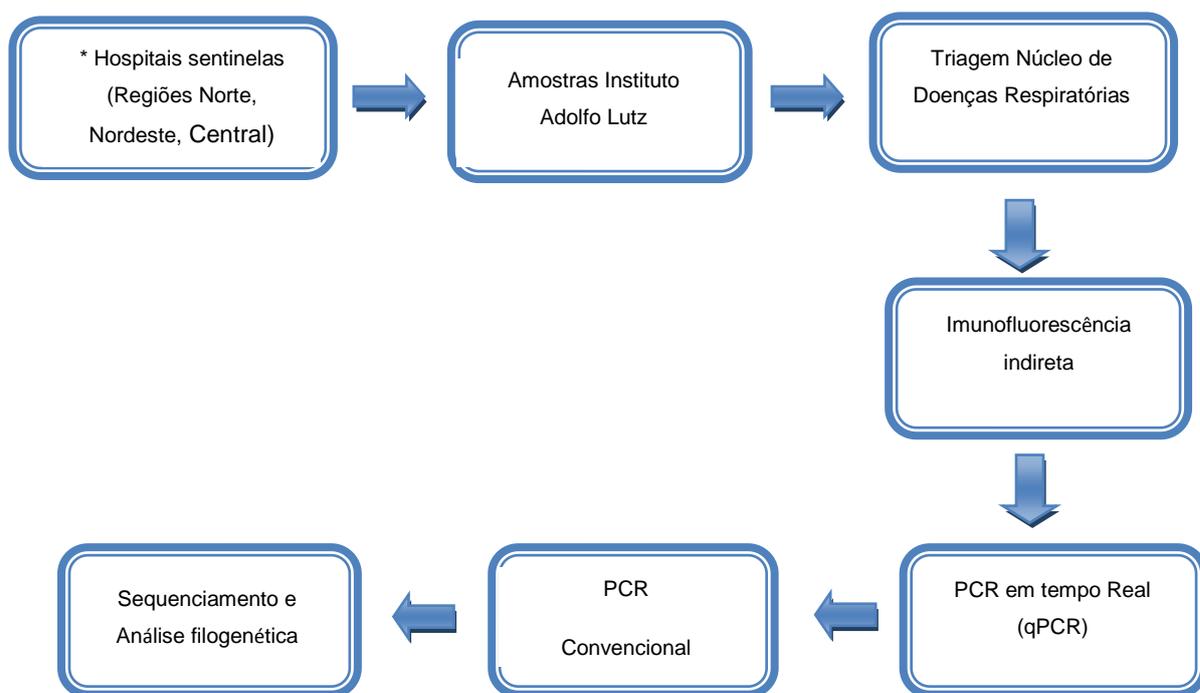
3. Materiais e Métodos

3.1 Casuística

Estudo retrospectivo durante o ano de 2010 com 300 amostras procedentes das Unidades Sentinelas da Rede Nacional de Influenza. Os hospitais Sentinelas incluídos neste estudo são: Hospital José Storopoli, Hospital Menino Jesus e o Hospital Geral de Guarulhos.

As amostras de nasofaringe foram coletadas de secreções respiratórias e pertencentes a crianças de 0 a 5 anos de idade, com sintomas respiratórios agudo do trato respiratório inferior que foram registradas e processadas no Núcleo de Doenças Respiratórias do Instituto Adolfo Lutz.

As amostras estavam aliqüotadas em freezer – 70°C e foram selecionadas seguindo-se o critério de negatividade para outros vírus respiratórios testados previamente, são eles: Vírus Respiratório Sincicial (VRS), Vírus da Influenza tipos A e B, Vírus da Parainfluenza 1, 2 e 3 e Adenovírus. A figura 5 mostra o fluxograma do procedimento realizado após o recebimento das amostras.



*Região Norte - Hospital Geral de Guarulhos,

Região Nordeste - Hospital Municipal Vereador José Storopelli,

Região Central - Hospital Municipal infantil Menino Jesus

Figura 5: Fluxograma do diagnóstico laboratorial para os pacientes com suspeita e sintomas respiratórios de infecção aguda do trato respiratório inferior.

3.2 Aspectos Éticos

O projeto utilizou material biológico armazenado, obtido de seres humanos, mas que, após processamento, consiste basicamente de material genético. Devido a isso, a Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz considerou o projeto isento conforme parecer anexado.

3.3 Métodos

3.3.1 Imunofluorescência Indireta

As amostras foram processadas por Imunofluorescência Indireta para os vírus: Influenza A, Influenza B, Vírus Respiratório Sincicial, Rinovírus,

Adenovírus e Para –influenza 1, 2, e 3. Foi utilizado o kit de identificação (Diagnostics Chemicon, Temecula, CA) conforme as instruções do fabricante.

3.3.2 Diagnóstico Laboratorial por PCR

3.3.2.1 Extração do Ácido Nucléico das Amostras Clínicas

Os ácidos nucleicos das amostras foram extraídos utilizando o protocolo otimizado do “Kit de extração de DNA” (QIAamp® DNA Mini Kit) para rápida e eficiente purificação de ácido nucléico viral. Utilizando microtubo estéril de 2,0mL, foi adicionado 200uL de secreção nasofaringe, 20uL de “proteínase K” e 200uL de “tampão AL” (incluso no Kit), seguido de incubação a 56^oC por 10 min. Após o período de incubação, centrifugou-se rapidamente para remover gotas da tampa. Foi adicionado 200uL de etanol absoluto. A mistura foi agitada no vortex e incubada por 15 segundos. Após adicionada a mistura na coluna de purificação do Kit, foi seguido de centrifugação 6.000xg por 1min. A coluna foi lavada com 500ul de tampão W1 “Buffer AW1” centrifugação 6.000 x g por 1min. Após foi adicionado 500ul de “Buffer AW2” centrifugação 6.000 x g por 1min de acordo com o protocolo do fabricante. O ácido nucléico foi eluído com 60uL “Buffer AE” (água estéril livre de RNase e DNase), após incubação por 5 min à temperatura ambiente e centrifugação a 6000 x g por 1 min. O material DNA extraído foi armazenado a -20^oC até o momento do uso.

3.3.2.2 PCR Tempo-Real

Os produtos da extração das amostras foram submetidos à técnica de PCR em Tempo Real para detecção do DNA viral, seguindo protocolo e primers descrito por Xiaoyan e Dean D. Erdman, CDC, (2010), visto na Tabela 1 estão descritos os iniciadores utilizados e a sonda “TaqMan®” marcada na região 5´terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluorescência) FAM e na região 3´terminal com Blackhole Quencher 1 (BHQ1).

Tabela 1: Relação dos *primers* e sondas utilizados na reação de PCR em Tempo Real da região do gene NP1/NS1.

Primers /Sondas	Sentido	Sequência (5'para 3') Sonda (FAM para BHQ1)	Gene	Posição na amostra
BoNS1	Sense	TGC AGA CAA CGC YTA GTT GTT T	NS1	1554–1575
BoNS1	Antisense	CTG TCC CGC CCA AGA TAC A	NS1	1641–1623
NS1	Sonda	CCA GGA TTG GGT GGA ACC TGC AAA	NS1	1598–1621
BoNP1	Sense	AGA GGC TCG GGC TCA TAT CA	NP-1	2478–2497
BoNP1	Antisense	CAC TTG GTC TGA GGT CTT CGA A	NP-1	2558–2537
NP1	Sonda	AGG AAC ACC CAA TCA RCC ACC TAT CGT CT	NP-1	2500–2528

Para avaliar a quantidade das amostras processadas com relação à recuperação do DNA extraído baseando-se no valor do CT e, à presença de possíveis inibidores da PCR, foi realizada uma PCR em tempo real de um controle interno endógeno cujo alvo foi a RNase P humana seguindo o protocolo recomendado pelo CDC para detecção do vírus influenza Tabela 2.

Tabela 2. Controle endógeno do gene alvo RNase P humana

Primer	Sentido	Seqüência (5'para 3')	Tamanho do produto amplificado
RnasePS	Sense	AGATTTGGACCTGCGAGCG	65 pares de bases
RnasePA	Antisense	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
RnaseP	Sonda	6-FAMd(TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG)BHQ-1	

Para esta reação foram adicionadas 5µL do DNA extraído de cada amostra em placa de 96 poços contendo em cada um 12,5µL de “Master Mix” da marca Invitrogen Life Technologies™, 0,5µL de “ROX” também da marca Invitrogen, 5µL de água ultra-pura livre de DNase e RNase da marca SIGMA-ALDRICH®, 0,5µL de “*primer*” F e 0,5µL de “*primer*” R descritos acima ambos da marca SIGMA-ALDRICH® 0,5µL da “Probe” da marca SIGMA-ALDRICH® e 0,5µL de “Taq DNA polimerase”(Invitrogen Life Technologies™) contendo um

volume final de 25µL. Esta placa foi colocada no aparelho “7500 Real-Time PCR System da Applied Biosystems™” e submetida aos seguintes ciclos: 1º ciclo 50°C por 10 minutos para desnaturação e 95°C 3 minutos para “Taq polimerase” e mais 45 ciclos por (95°C 15 seg. para desnaturação e 60°C 60 seg. para anelamento e extensão).

3.3.2.3 Validação dos Ensaios de PCR em Tempo-Real e PCR Convencional

Para avaliação da especificidade e sensibilidade dos ensaios de PCR em tempo Real e PCR foram selecionados grupos positivos e negativos estocados na Seção. As amostras positivas de ensaios anteriores foram realizadas sequenciamento e estocadas para serem utilizadas como padrão nas reações e as negativas procedentes de outras infecções.

3.3.2.4 Amplificação do DNA Viral por PCR Convencional para Verificação das bandas para Sequenciamento.

A amplificação do DNA para sequenciamento foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos (*primers*) baseados na região do gene VP1/VP2 descritos por Durigon (2010). Tabela 3.

Tabela 3: Relação dos *primers* utilizados na reação de PCR para sequenciamento.

Primers	Sentido	Seqüência (5'para 3')	Gene	Posição na amostra	Tamanho do fragmento
HBoVF1	Senso	ACCACCAAGTACTTAGAACTGG	VP1/VP2	4128-4149	637pb-
HBoVR1	Antisenso	AATAGTGCCTGGAGGATGATCC	VP1/VP2	4785-4765	

A reação de PCR foi realizada pela adição de 10µL do produto do DNA extraído em 5µL de “tampão 10x” (Tris-HCL 20mM (pH8,4), 50mM de KCL), 1µL de “MgCL2” (2mM), 1µL de “DNTPs” (oligonucleotídeos na concentração de 0,2 mM), 0,3µL de “Taq DNA Polimerase” (1,5 U), 35,2µL água ultrapura

todos da marca (Invitrogen Life Technologies™) e 1,25µL dos “*primers*” da marca (SIGMA-ALDRICH®), descrito no quadro 3, para volume final de 50µL.

As amostras foram amplificadas em termociclador da marca (Applied Biosystems®), com etapas de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação das fitas; 56°C por 45 seg. para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 min para extensão da fita de DNA, seguida por etapa final de 72 por 7 min para completar a extensão. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C até o próximo procedimento.

3.3.2.5 Análise dos Produtos Amplificados.

A detecção dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em 100mL de tampão TBE (45mM de Tri-Borato, 1mM de EDTA (pH 8,0) e 0,8 ug/ml de gel red (Unisafe Dye®) fabricado por Uniscience do Brasil. Uma alíquota de 10ul da amostra misturados com 2ul de azul de bromofenol foi submetida a eletroforese em cuba horizontal, imerso em tampão TBE durante 30 minutos a 100volts. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz violeta, onde demonstrou a amplificação de 637 pb.

3.3.2.6 Purificação do Produto Amplificado

O produto do PCR convencional foi purificado com “Kit Centri-Sep Columns” (Princeton Separations, INC. Adelphia) e processado de acordo com o fabricante: para remover excesso de dideoxynucleotídeos presentes na reação para então realizar o sequenciamento. A qualidade da purificação e a quantificação foram realizadas visualmente com o “Low Mass DNA Ladder” (Invitrogen Life Technologies™) por meio de uma corrida eletroforética em gel de agarose 2% com 4µL de DNA purificado, obtendo-se a concentração em ng/µL.

3.3.2.7 Sequenciamento do Gene VP1/VP2

O produto purificado de DNA foi sequenciado segundo método enzimático de terminação em cadeia utilizando o kit comercial “ABI PRISM Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit”. A amostra utilizada no volume contendo de 10ng a 30ng do produto purificado, 3,2pMol de oligonucleotídeos (sense e antisense), 2ul de enzima marcada com corante (Big Dye – Applied Biosystems. Inc., EUA), 2ul de tampão do Kit (Tris HCL 200mM pH 9,0 e 5mM MgCL2) e água pura para completar o volume de 10ul. As reações foram realizadas em duplicata, para resultado fidedigno. A extensão será em termociclador. 96°C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 10 seg e 60°C por 4 min. O novo produto obtido foi purificado com “Kit Centri-Sep Columns” (Princeton Separations, INC. Adelphia) e processado de acordo com o fabricante como descrito no item acima e colocado no sequenciador automático “ABI Prism 3130x” (Applied Biosystems).

3.3.2.8 Processamento e Alinhamento das Sequências dos genes VP1/VP2.

As sequências de DNA obtidas da região do gene VP1 e VP2 foram editadas com programas de computador específicos, o programa chromas V. 2.23(©1998-2002 Technelysium Pty LTD) para verificar erros e discrepâncias entre as fitas sequenciadas, o programa Clustal W v 1.7 para realizar o alinhamento das sequências obtidas e as sequências finais foram editada no programa Bioedit v. 7.0.0.

3.3.2.9 Análise Filogenética.

A construção da árvore filogenética e análise de distância entre as sequências foram feitas utilizando o programa “Meg Align™ 4.05” do “Expert Analysis Software” (DNASTAR, Inc. EUA).

4. Resultados

4.1 Imunofluorescência Indireta

Todas as 300 amostras testadas foram negativas por Imunofluorescência Indireta para os vírus de Influenza A e B, Vírus Respiratório Sincicial, Parainfluenza 1, 2 e 3.

4.2 PCR em Tempo Real para detecção do bocavírus

Das 300 amostras negativas para os outros vírus respiratórios e analisadas para detectar o Bocavírus, 49 amostras (16,3%) foram positivas para HBoV. Os hospitais Sentinelas representam três regiões da cidade de São Paulo: Hospital Municipal Vereador José Storopoli (Região Nordeste), Hospital Municipal Infantil Menino Jesus (Região Central) e o Hospital Geral de Guarulhos (Região Norte). As distribuições das amostras por região estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição das amostras positivas por Região na cidade de São Paulo.

	Total de Amostras	Amostras Positivas
Região Norte (Hospital Geral de Guarulhos)	101	7,30%
Região Nordeste (Hospital Municipal Vereador José Storopoli)	104	7%
Região Central (Hospital Municipal Infantil Menino Jesus)	95	2%

Entre as amostras analisadas, 25 são de pacientes femininos e 24 masculinos (Tabela 5). Entre os pacientes positivos, podemos observar que o intervalo entre os sintomas e a coleta foi de aproximadamente de 2 a 3 dias. Também podemos observar o valor de CT de cada amostra detectada por qPCR Real Time. As amostras com asterisco foram processadas para o sequenciamento gênico por apresentarem uma maior quantidade DNA e o mesmo estar menos degradado que o das outras amostras positivas.

Tabela 5 – Identificação dos pacientes positivos por qPCR Real Time e sequenciamento.

Local	Paciente	Idade	Sexo	Data Sintomas	Data Coleta	qPCR CT
H.M.I.M.J	1	4 A.	M	15/02/2010	18/02/2010	35.36
H.V.M	2	9 M.	F	02/03/2010	04/03/2010	22.77*
H.M.I.M.J	3	5 A.	F	02/03/2010	04/03/2010	37.41
H.V.M	4	1 A.	M	11/03/2010	11/03/2010	23.22
H.V.M	5	1 A.	F	31/03/2010	01/04/2010	23.61
H.V.M	6	11 M	M	13/04/2010	15/04/2010	38.83
H.M.I.M.J	7	8 M	F	14/04/2010	15/04/2010	39.48
H.V.M	8	2 A.	M	13/04/2010	15/04/2010	38.7
H.V.M	9	4 A.	M	19/04/2010	22/04/2010	38.18
H.V.M	10	2 A.	F	20/04/2010	22/04/2010	37.93
H.V.M	11	9 M.	F	20/04/2010	22/04/2010	21.14
H.M.I.M.J	12	3 A.	M	27/04/2010	29/04/2010	30.77
H.M.I.M.J	13	4 A.	M	04/05/2010	06/05/2010	15.34
H.M.I.M.J	14	8 M	F	02/05/2010	06/05/2010	36.07
H.M.I.M.J	15	3 A.	F	09/05/2010	13/05/2010	34.92
H.M.I.M.J	16	6 M	F	11/05/2010	13/05/2010	25.77
H.M.I.M.J	17	1 A.	M	19/05/2010	20/05/2010	32.75*
H.V.M	18	11 M	M	17/05/2010	20/05/2010	20.68
H.M.I.M.J	19	1 A.	M	26/05/2010	27/05/2010	35.81
H.V.M	20	2 A.	F	25/05/2010	27/05/2010	34.96
H.M.I.M.J	21	2 A.	M	08/06/2010	10/06/2010	41.67
H.M.I.M.J	22	1 A.	F	16/06/2010	17/06/2010	41.86
H.V.M	23	2 A.	F	14/06/2010	17/06/2010	41.07
H.G.G	24	8 M	M	07/07/2010	08/07/2010	41.28
H.M.I.M.J	25	1 A.	M	13/07/2010	15/07/2010	37.93
H.V.M	26	4 A.	M	19/07/2010	21/07/2010	37.2
H.G.G	27	1 A.	M	21/07/2010	23/07/2010	37.65
H.G.G	28	1 A.	F	17/08/2010	19/08/2010	40.21
H.V.M	29	8 M.	F	25/08/2010	26/08/2010	36.55*
H.M.I.M.J	30	2 M	F	28/08/2010	31/08/2010	36.24
H.M.I.M.J	31	2 M	F	29/08/2010	31/08/2010	35.49*
H.V.M	32	1 A.	F	31/08/2010	02/09/2010	38.01
H.V.M	33	1 A.	M	30/08/2010	02/09/2010	37.75
H.M.I.M.J	34	5 M.	M	30/08/2010	02/09/2010	38.64
H.M.I.M.J	35	3 M	F	29/08/2010	02/09/2010	37.72*
H.M.I.M.J	36	1 A.	M	11/09/2010	15/09/2010	19.36*
H.V.M	37	1 A.	F	13/09/2010	16/09/2010	39.14
H.V.M	38	1 A.	F	13/09/2010	16/09/2010	36.52
H.V.M	39	1 A.	F	22/09/2010	23/09/2010	43.37
H.V.M	40	1 A.	F	05/10/2010	07/10/2010	40.29
H.M.I.M.J	41	3 A.	M	11/10/2010	13/10/2010	31.51*
H.G.G	42	1 M	M	11/10/2010	13/10/2010	33.79
H.G.G	43	6 M	M	10/10/2010	13/10/2010	37.09
H.V.M	44	4 A.	F	27/10/2010	28/10/2010	22.01*
H.G.G	45	4 A.	M	18/10/2010	20/10/2010	38.11*
H.V.M	46	8 M	F	26/10/2010	28/10/2010	39.19
H.V.M	47	10 M	F	08/11/2010	11/11/2010	39.99*
H.M.I.M.J	48	1A.	M	14/11/2010	17/11/2010	24.25*
H.M.I.M.J	49	1 A.	M	21/11/2010	24/11/2010	28.76*

* Amostras Sequenciadas

H.G .G - Hospita Geral de Guarulhos

H.V.M - Hospital Municipal Vereador José Storopoli

H.M.I.M.J - Hospital Municipal Infantil Menino Jesus

Em relação aos positivos nas faixas etárias estudadas foram: 34(69,4%) positivos de 0 a > 12 meses, 5(10,2%) de 13 a > 24 meses, 3(6,1%) de 25 a > 36 meses e 6(12%) de 37 a > 48 meses (Figura 10).

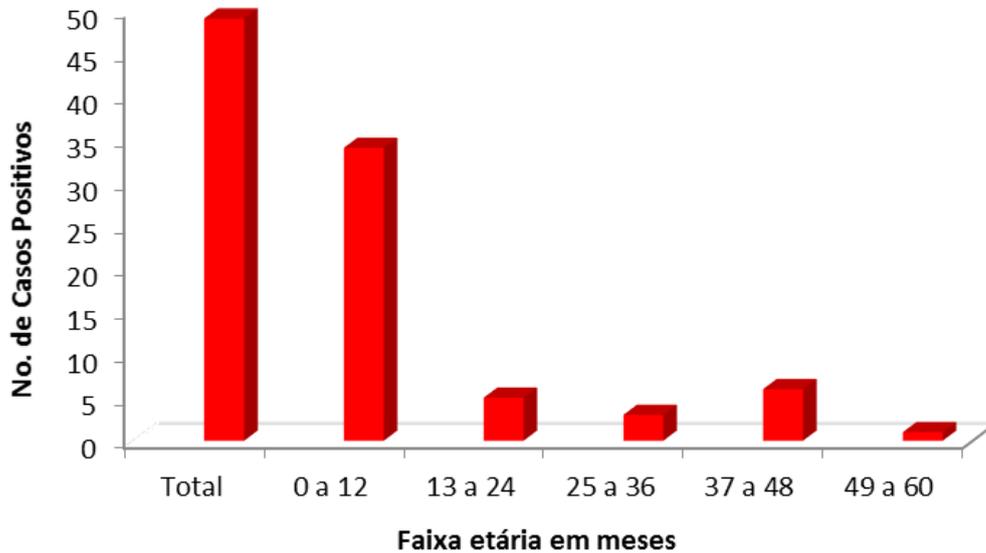


Figura 6: Distribuição etária dos casos positivos de Bocavírus. O eixo Y indica o número de casos positivos, enquanto o eixo X representa número total de amostras positivas e a distribuição dos casos positivos relacionados aos cinco grupos de idade analisados.

Os pacientes que foram positivos para HBoV apresentaram os seguintes sintomas: febre, tosse, coriza e obstrução nasal. E a faixa etária de 49 a > 60 com apenas 1 amostra positiva apresentou somente os sintomas de febre e tosse (Figura 7).

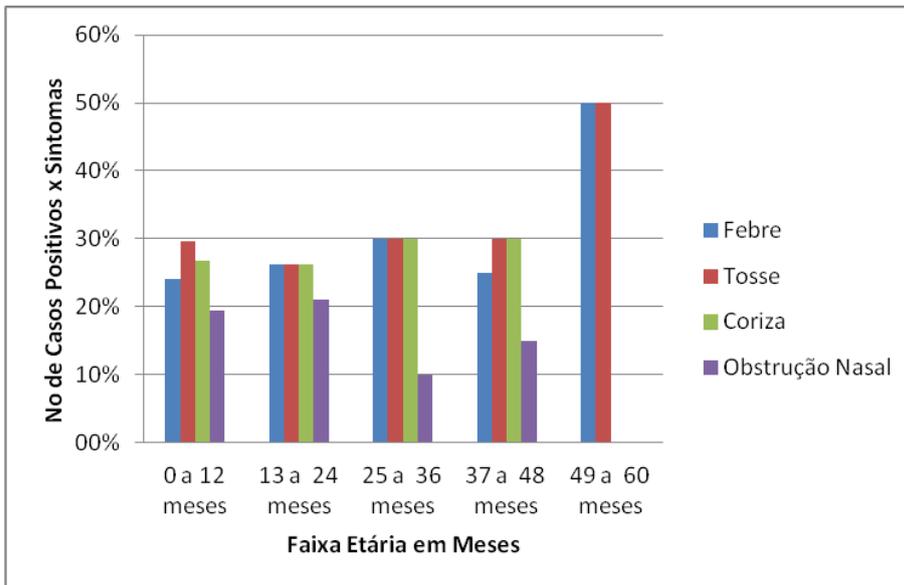


Figura 7: Distribuição dos casos positivos versus sintomas. O eixo Y indica o número de casos positivos e os sintomas relacionados, enquanto o eixo X representa os cinco grupos de idade analisados.

4.2.1 Validação dos Ensaios de PCR em Tempo-Real.

A figura 8 apresenta o perfil logaritmo da absorbância emitida durante cada ciclo no protocolo da curva de concentração decrescente para o protocolo de PCR em tempo real para a detecção do Bocavírus humano. Neste gráfico exemplifica a interpretação do resultado estão incluídas 10 amostras positivas e 10 amostras negativas para a análise da precisão das medidas. Registro de resultado de experimento interpretado pelo programa do equipamento ABI7500 v2.0.5.

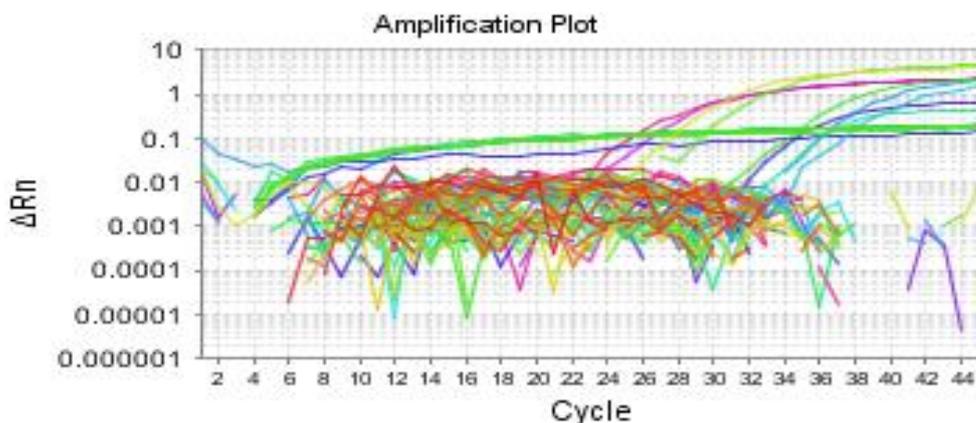


Figura 8: Curva de concentração de PCR em tempo real emitido através do equipamento ABI7500.

A análise de uma amostra positiva vista no equipamento ABI7500 programa “multicomponent Plot” a emissão de fluorescência emitida em relação ao ciclo 32 observa-se aumento da emissão fluorescente de 100.000 para 150.000. Exemplificando a interpretação do resultado da amostra positiva. (Figura 13)

4.3 Resultado do PCR Convencional para Sequenciamento.

As 12 amostras amplificadas através do PRC convencional mostram um DNA sem muita degradação e em uma boa quantidade para que seja purificado para realização do sequenciamento.

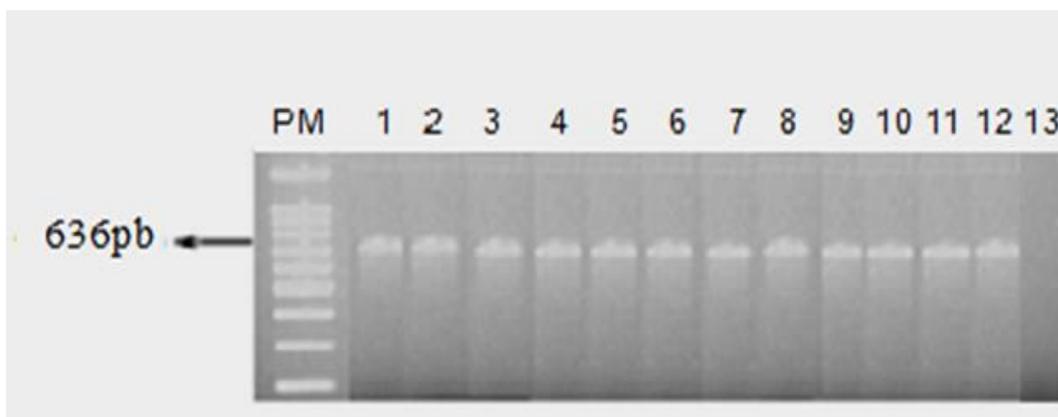


Figura 9: Detecção do produto da PCR das amostras positivas. Imagem do gel de agarose 1%, obtida no transiluminador linha PM: Padrão de peso molecular 1kb. Linhas 1 a 12 amostras amplificadas, linha 13 é o controle negativo água.

4.4 Resultado do Sequenciamento

Foram amplificadas da região VP1/VP2 do genoma do vírus Bocavírus 12 amostras para caracterização molecular (Tabela 6).

Tabela 6: Identificação dos Casos que Foram Sequenciados.

Pacientes	Identificação	Idade	Data de Início dos Sintomas	Data da Coleta	Sexo	Local	CT
2	KY906239	9 meses	02/03/10	04/03/10	F	H.V.M	22.77
49	KY906240	1 ano	21/11/10	24/11/10	M	H.M.I.M.J	32.75
45	KY906241	4 anos	18/10/10	20/11/10	M	H.G.G	36.55
48	KY906242	1 ano	14/11/10	17/11/10	M	H.M.I.M.J	35.49
29	KY906243	8 meses	25/08/10	26/08/10	F	H.V.M	37.72
17	KY906244	1 ano	19/05/10	20/05/10	M	H.M.I.M.J	19.36
41	KY906245	3 anos	11/10/10	13/10/10	F	H.M.I.M.J	31.51
31	KY906246	2 meses	29/08/10	31/08/10	F	H.M.I.M.J	22.01
44	KY906247	4 anos	27/10/10	28/10/10	F	H.V.M	38.11
47	KY906248	10 meses	08/11/10	11/11/10	F	H.V.M	39.99
35	KY906249	3 meses	29/08/10	02/09/10	F	H.M.I.M.J	24.25
36	KY906250	1 ano	11/09/10	15/09/10	M	H.M.I.M.J	28.76

*H.M.I.M.J – Hospital Municipal Infantil Menino Jesus

*H.G.G – Hospital Geral de Guarulhos

*H.V.M – Hospital Municipal Vereador José Storopoli Vila Maria

O alinhamento e tradução das sequências de nucleotídeos do gene da proteína VP1/VP2 do Bocavírus visto na Figura 10 são as sequências geradas em nosso estudo (KY906239, KY906240, KY906241, KY906242, KY906243, KY906244, KY906245, KY906246, KY906247, KY906248, KY906249, KY906250) que estão representadas nas sequências para os grupo HboV 1 (EU984231, DQ457413, EU984244, AB480173, AB480171, DQ778300), grupo HboV 2 (NC012564, EU082213) e grupo HboV 3 (NC012042) que foram alinhadas no programa Clustal X e editadas no programa Bioedit.

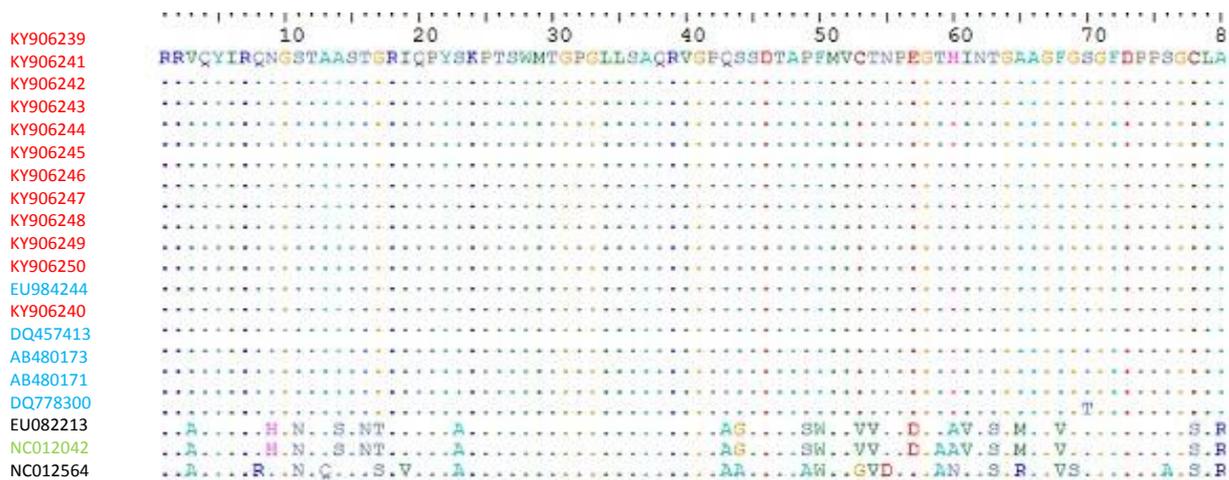


Figura 10 - Sequências editadas no programa Bioedit, traduzidas para o gene da proteína VP1/VP2. As sequências BrSP (Brasil, São Paulo) são as estudadas neste trabalho em relação a sequências obtidas do GenBank utilizadas na análise como padrão dos grupos HboV1, HboV2 e HboV3.

As sequências geradas neste estudo depois de alinhadas com sequências representativas dos diferentes grupos do Bocavírus humano resultou em uma árvore filogenética, que agrupou as 12 amostras brasileiras no grupo 1 demonstrada na Figura 11. Os resultados da análise filogenética mostraram que as amostras encontradas pertencentes ao grupo 1, são semelhantes aos que circulam em Taiwan, China e Japão. A similaridade entre as sequências de nucleotídeos das amostras intra-grupo do genótipo 1 variou de 100% a 99,4% respectivamente (Figura 12). Quando as sequências nucleotídicas das amostras do grupo 1 são comparadas com o genótipo 2 a similaridades nucleotídicas entre os genótipos 1 com o genótipo 2 variou de 76% a 77,9%. Em relação ao genótipo 3 variou de 73,2% a 73,9%.

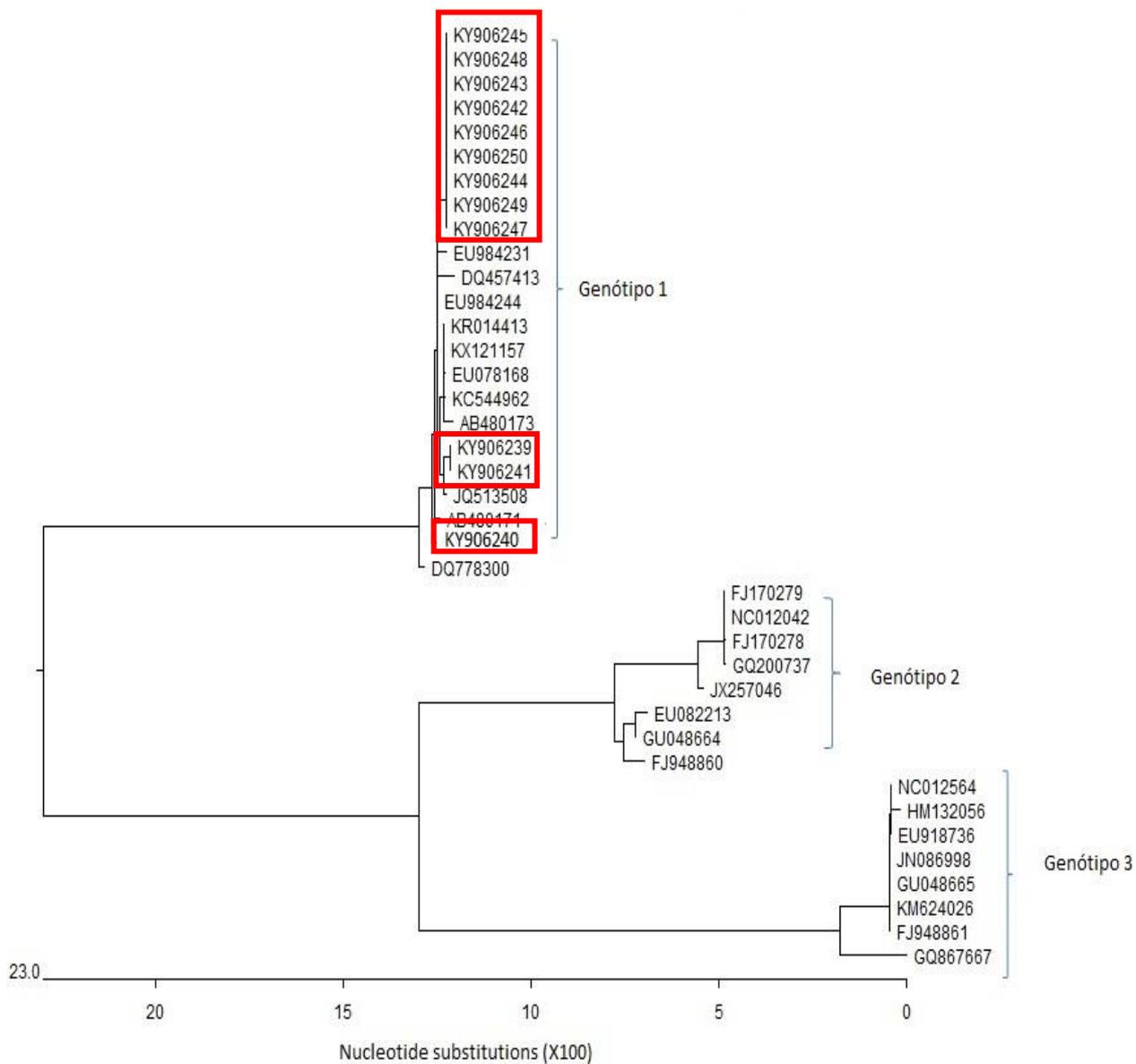


Figura 11: Árvore Filogenética das sequências da proteína VP1/VP2 do Bocavírus humano sequenciados no Estado de São Paulo amostras referentes ao ano de 2010 e comparadas com sequencias de referência do Bocavírus humano depositadas no GenBank. As amostras sequenciadas pertencem ao genótipo HBoV1 destacadas em vermelho.

PORCENTAGEM DE IDENTIDADE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
D I V E R G E N C I A	1	100.0	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.6	99.4	99.4	99.1	99.6	99.4	99.4	77.5	76.0	73.2	1	KY906239	
	2	0.0	100.0	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.6	99.4	99.4	99.1	99.6	99.4	99.4	77.5	76.0	73.2	2	KY906241	
	3	0.6	0.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	3	KY906242	
	4	0.6	0.6	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	4	KY906243	
	5	0.6	0.6	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	5	KY906244	
	6	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	6	KY906245	
	7	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	7	KY906246	
	8	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	8	KY906247	
	9	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	9	KY906248	
	10	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	10	KY906249	
	11	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.8	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	11	KY906250
	12	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	100.0	99.8	99.6	99.6	99.8	99.4	77.7	76.2	73.4	12	EU984244	
	13	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	100.0	99.6	99.4	99.6	99.1	77.9	76.4	73.7	13	KY906240	
	14	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	100.0	99.4	99.4	99.6	99.1	77.5	76.0	73.2	14	DQ457413
	15	0.9	0.9	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.6	0.6	100.0	99.1	99.4	98.9	77.3	75.8	73.2	15	AB480173
	16	0.4	0.4	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.6	0.6	0.9	100.0	99.4	98.9	77.5	76.0	73.2	16	AB480171
	17	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.6	0.6	100.0	99.1	77.9	76.4	73.7	17	DQ778300
	18	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6	0.9	0.9	1.1	1.1	0.9	100.0	77.7	76.2	73.9	18	EU082213
	19	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.8	26.5	26.2	26.8	27.1	26.8	26.2	26.5	100.0	96.4	82.7	19	NC012042
	20	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	28.7	28.3	29.0	29.3	29.0	28.3	28.7	3.7	100.0	82.2	20	NC012564
	21	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	32.8	32.5	33.2	33.2	33.2	32.5	32.2	19.7	20.3	100.0	21	

Figura 12- Quadro de similaridade e divergência entre as seqüências analisadas e do GenBank. Análise de identidade e divergência, pelo método ClustalX, das amostras sequenciadas na região VP1/VP2 do vírus Bocavírus. No quadro em vermelho as amostras brasileiras e em azul as amostras do GenBank.

5. Discussão

As infecções respiratórias agudas (IRA) constituem causa de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 13% dos óbitos em crianças menores de 5 anos de idade devem-se às infecções respiratórias agudas (IRA), proporção que pode ser mais elevada em lactentes. Fato que nos levou ao desenvolvimento deste estudo selecionando a faixa etária em crianças menores de 5 anos de idade.

Os vírus são os mais frequentes agentes etiológicos de infecções respiratórias agudas e são responsáveis por considerável número de hospitalizações em crianças, inclusive no Brasil (Brasil, Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde,2010). Os vírus respiratórios mais comumente relacionados com IRA são o bocavírus (HBoV), vírus sincicial respiratório (RSV), vírus Parainfluenza (PIV), rinovírus (RV), adenovírus (ADV), coronavírus (CoV) e metapneumovírus (MPV). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde de 2008, mais de 8 milhões de mortes ocorreram entre crianças menores de idade naquele ano, 99% em países de baixa ou média renda, que incluem o Brasil. (Ministério da Saúde,2010)

O diagnóstico etiológico viral de IRA que inicialmente era realizado com base em isolamento em culturas de células e por isso restrito a laboratórios especializados, popularizou-se com o surgimento da imunofluorescência para detecção de antígenos virais. Porém, nas últimas décadas, o diagnóstico passou a ser realizado através da detecção de genomas virais pela técnica da reação de polimerização em cadeias (PCR). Diante da nova realidade na detecção de vírus respiratórios, possibilitou a descoberta de um novo vírus respiratório, que foi chamado de bocavírus humano. Demonstrada em nossos estudos mediante a técnica molecular de PCR em tempo Real desenvolvida pelo CDC e implantada em nosso laboratório.

O bocavírus foi descrito em 2005, na Suécia em crianças suecas que apresentavam sintomas de infecção do trato respiratório (IRA), mas que não tinham nenhum agente etiológico conhecido detectável.

Das 300 amostras investigadas para HBoV, 49 amostras foram positivas somando 16,3% do total que está dentro da faixa de 1,5% a 19% de positividade quando investigada infecções somente pelo HBoV. Segundo dados apresentados na literatura nossos resultados apresentaram-se porcentagens concordantes com os existentes no Brasil descritos por (DURIGON et al., 2010; SANTOS et al., 2010;) e em outros países (KAPOOR et al., 2014; WEISSBRICH et al., 2006; TYUMENTSEV et al., 2014; CHENG et al., 2011; MANNING et al., 2007).

HBoV está associado a infecções do trato respiratório em crianças, incluindo quatro genótipos (HBoV1-HBoV4) Entre os quatro genótipos HBoV reconhecidos, HBoV1 tem sido mais frequentemente associado ao SARI. A prevalência de diferentes genótipos HBoV varia entre a mesma região. Apenas dados limitados estão disponíveis sobre a prevalência de infecção por HBoV em crianças SARI. Também foi observado em nosso estudo que o genótipo HboV1 é um dos principais patógenos circulantes em crianças menores de 2 anos. Os resultados são consistentes com os obtidos por outros autores em diferentes estados e regiões do mundo (BASTIEN et al., 2006), (ALLANDER et al., 2007) e também no Brasil (SOUZA et al., 2010), (ALBUQUERQUE et al., 2009) (GAGLIARDI et al., 2009).

Estudos soroepidemiológicos mostram que a taxa de soropositivos em crianças com idade inferior a 3 meses é de 90,5%, mas cai para 5,6% em crianças de 6-8 meses de idade, provavelmente devido a níveis decrescentes de anticorpos maternos-adquiridos (ENDO et al., 2007). A percentagem de pacientes soropositivos para o HBoV aumenta com a idade, de modo que todas as crianças até seis anos de idade já foram expostas ao HBoV. Estudo realizado por Kahn et al., 2008, mostrou 91,8% dos lactentes menores que 2 meses de idade são HBoV soropositivos, e a taxa de soropositivos é a mais baixa (25,0%) em crianças de 4 meses, mas atinge 85% em crianças > 48 meses de idade. Em conjunto, estes dados sugerem que crianças com menos

de 4-6 meses de idade podem ser protegidos da infecção HBoV pelos anticorpos maternos, e que a primeira infecção por HBoV ocorre após a perda desses anticorpos. Além disso, a baixa detecção de HBoV em crianças acima de 2 anos e adultos foi confirmado por vários estudos (ALLANDER et al., 2005; FRY et al., 2007; LAU et al., 2007; CAMPOS et al., 2016; TABASI et al., 2016). As crianças do nosso estudo, (Figura 06) são pacientes graves de hospitais sentinelas das principais regiões de São Paulo.

Entre os sintomas, a tosse apresentou maior porcentagem, seguido da coriza e febre. Além disso, vários estudos mostram que o HBoV é a principal causa grave da exacerbação da asma em crianças (NAGHIPOUR et al., 2007; VALLET et al., 2009). Deng et al., 2012; mostrou que a carga viral do HBoV pode levar a maior duração da dificuldade respiratória e hospitalização em crianças com infecção do trato respiratório inferior grave, enquanto que a co-infecção com outros vírus não influenciam na gravidade da doença e na evolução da infecção HBoV.

As amostras positivas foram identificadas através da reação de PCR tempo real amplificando a região dos genes NP1 e NS1 utilizando *primers* descritos por Xiaoyan e Dean D. Erdman, CDC (2010), esta região foi escolhida para amplificação devido este gene ser encontrado exclusivamente no gênero Bocavírus, não estando presente em nenhum dos outros representantes da família Parvoviridae.

A análise filogenética de nossas amostras, mostrou que o genótipo 1 do HBoV circulou no Estado de São Paulo durante o ano de 2010. Recentemente, no Brasil, foi identificada a circulação de HBoV-2 e HBoV-3 em pacientes com gastroenterite aguda. Foram analisadas 144 amostras (fecais), destas o HBoV-3 foi detectado em 0,6% das amostras e o HBoV-2 em 20,8% (SANTOS et al., 2010). O HBoV genótipo 1 é fortemente relacionado com doença respiratória.

Estudos realizados identificaram que o genótipo HBoV2-4 em amostras de crianças com doenças respiratórias. Este genótipo é raramente relacionado às doenças respiratórias, mas é comum em fezes de crianças com

gastroenterite. Esses resultados sugerem que talvez o HBoV2-4 seja proveniente da mucosa gastrointestinal e devido a contaminação com secreções orais a criança infecta o trato respiratório, embora sejam necessários mais estudos que determinar se o HBoV2-4 está associado com as infecções do trato respiratório (ARTHUR et al., 2009; CHIEOCHANSIN et al., 2009; KAPOOR et al., 2009, 2010, SANTOS et al., 2010; CAMPOS et al., 2016).

A nossa análise filogenética, da região do gene que analisamos, mostrou-se que o HBoV1 é altamente conservado com baixo grau de variabilidade genética, podendo ser observado na figura 10 e 12, conforme descrito por outros autores (ALLANDER et al. 2005; CHUNG et al., 2006; KESEBIR et al., 2006; LAU et al., 2007; NESKE et al., 2007; BRUNING et al., 2016; KHALFAOVI et al., 2016; JIANG et al., 2016). Devido ao seu baixo grau de variabilidade genética, alguns autores sugerem que a infecção por HBoV possa ocorrer apenas uma vez, devido a imunidade adquirida de anticorpos neutralizantes. Além disso, as infecções respiratórias por HBoV1 possuem um padrão homogêneo nas suas características clínicas e epidemiológicas, devido a baixa diversidade genética do vírus. Em apoio a esta possibilidade, nossos resultados mostram que não houve diferenças significativas na variabilidade genética do HBoV (Figura 7).

Nossas amostras analisadas são próximas das amostras do grupo HboV1 que circula na Ásia (Taiwan, China e Japão). Além disso, estudos mostram que o HBoV que circula no mundo todo como única linhagem composta de dois genótipos sutilmente diferentes que circulam num mesmo período. Estes resultados mostram que o HBoV é altamente conservado e além disso, especular que o HBoV entrou na população humana mais recentemente do que o parvovírus B19 (CHIEOCHANSIN et al., 2007; NESKE et al., 2007).

6. Conclusões

- O HBoV sugere ser um patógeno viral importante e frequente em crianças com SRAG na região metropolitana de São Paulo;
- O genótipo circulante encontrado foi o HBoV tipo 1, corroborando que esse genótipo em particular é fortemente associado com a doença respiratória;
- O diagnóstico diferencial é importante para a vigilância epidemiológica no auxílio clínico para a conduta no tratamento;
- Os dados genéticos obtidos contribuem para o conhecimento da diversidade molecular do HBoV-1 circulante no Brasil.

7. Referências

Albuquerque MCM, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhã AG, Ramírez ML et al. Novel Respiratory Virus Infections in Children, Brazil. *Emerg Infect Diseases* 2009; 15(5): 806-808.

Allander T. Human Bocavirus. *Journal of Clinical Virology* 2008; 41: 29-33.

Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lethinen P, Österback R et al. Human Bocavirus and Acute Wheezing in Children. *Clin Infect Diseases* 2007; 44: 904-10.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *PNAS* 2005; 102(43): 12891-12896. Cgl/doi 10.1073/pnas.0504666102.

Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinovirus, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol.* 2006;78(9):1232-40.

Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH, et al. Human bocavirus: Prevalence and Clinical Spectrum at a Children's Hospital. *Clin Infect Diseases* 2006; 43: 283-8.

Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLOS Pathog.* 2009; 5(4): e1000391.

Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus Infection, Canada. *Emerg Infect Diseases* 2006; 12(5): 848-850.

Berns K, Parrish CR. Parvoviridae. In: Knipe DM, Howley PM(eds). *Fields Virology* Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; Philadelphia, 2007 p.2437.

Berry M, Gamielien J, Fielding BC. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *J Viruses* 2015; 7: 996-1019 doi: 10.3390/v7030996.

Bin S, Yingyue C, Yongshu L et al. The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells. *Virology* 2013, 440: 75-83.

Brieu N, Gay B, Segondy M, et al. Electron microscopy observation of human bocavirus (HBoV) in nasopharyngeal samples from HBoV-infected children. *J. Clin Microbiol.* 2007; 445(10): 3419-20.

Bruning AHL, Susi P, Toivola H, Christensen A, Söderlind-Venermo M, Hedman K, et al. Detection and monitoring of human bocavirus I infection by a new rapid antigen test. *New Micro and New Infec* 2016; 11: 17-19.

Campos GS, Sampaio MLS, Menezes ADL, Tigre DM, Costa LFM, Chinalia FA, et al. Human bocavirus in Acute Gastroenteritis in children in Brazil. *J Med Virol* 2016; 88: 166-170.

Cheng W, Chen J, Xu Z, Yu J, Huang C, Jin M et al. Phylogenetic and recombination analysis of human bocavirus 2. *BMC Infectious Diseases* 2011; 11: 50 doi:10.1186/1471-2334.

Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, Poovorawan Y, Simmonds P. Absence of detectable replication of human bocavirus species 2 in respiratory tract. *Emerg Infect Diseases* 2009; 15(9): 1503-1505.

Choi JH, Chung YS, Kim KS, Lee WJ, Chung LY, Oh HB, Kang C. Development of real-time PCR assays for detection and quantification of human bocavirus. *J Clin Virology* 2008; 42:249-253.

Chow BDW, Esper FP. The Human bocaviruses: A Review and Discussion of their role in Infection. *Clin Lab Med* 2009; 29:695-713.

Chung JY, Han TH, Kim JS, Kim SW, Park CG, Hwang ES. Th1 and TH2 cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis. *J Clin Virol* 2008; 43: 223-225.

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D.. ****Molecular Cell Biology.****Second Edition. Scientific American Books. Distributed by W. H. Freeman and Company, New York. 1990 p. 213.

Deng Y, Gu X, Zhao X, Luo J, Luo Z, Wang L et al. High Viral Load of Human bocavirus correlates with duration of wheezing in children with severe lower respiratory tract infection. PLoS ONE 2012; 7(3):e34353 doi:10.1371/journal.pone.0034353.

Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. J Virol 2009; 83(15): 7739-7748.

Durigon GS, Oliveira DBL, Vollet SB, Storni JG, Felício MCC, Finelli C et al. Hospital-acquired human bocavirus in infants. J Hospital Infection 2010; 76: 171-173.

Endo R, Iohiguro N, Kikita H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido Prefecture, Japan. J Clin Microb 2007; 45(10): 3218-3223.

Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human Bocavirus in French Children. Emerg Infect Diseases 2006; 12(8); 1251-1253.

Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF et al. Human bocavirus: a novel Parvovirus Epidemiologically associated with Pneumonia requiring hospitalization in Thailand. J Infect Diseases 2007; 195: 1038-45.

Fu X, Wang X, Ni B, Shen H, Wang H, Zhang X et al. Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus. Virology Journal 2011; doi: 10.1186/1743-422x-8-182.

Gagliardi TB, Iwamoto MA, Paula FE, Proença-Modena JL, Saranzo AM, Criado MF et al. Human bocavirus respiratory infections in children. Epidemiol Infect 2009; 12: 1-5.

Gurda BL, Parent KN, Blade KH, Sinokovits RS, Di Mattia MA, Rence C et al. Human bocavirus capsid structure: In Sights into the structural repertoire of the Parvoviridae. Jor Virology 2010; 84(12): 5880-5889.

Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus – the first 5 years. Rev Med Virol 2012; 22: 46-64.

Jiang W, Yin F, Zhou W, Yan Y, Ji W. Clinical significance of different virus load of human bocavirus in patients with lower respiratory tract infection. *Nature.com.scientificreports* 2016 6:20246 doi:10.1038/srep20246.

Kai W, Wang W, Yan H et al. Correlation between bocavirus infection and humoral response and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection. *J. Clin. Virology*, 2010; 47: 148-155.

Kahn JS, Kesebier D, Cotmore SF, D'Abrano A, Cooby C, Weibel C et al. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. *J Infect Disease* 2008; 198(1): 41-50.

Kantola K, Herdman L, Allander T, Jartti T, Lehtinen P, Ruuskanen O, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Diseases* 2008; 46: 540-6.

Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, Shamoan HE, Abd-Eldayem SA, Hart CA. Human Bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Diseases* 2006; 12(9): 1418-1420.

Kapoor A, Horning M, Asokan A, Willians B, Henriquez JA, Lipkin WI. Bocavirus Episome in infected human tissue contains Non-Identical Termini. *PLoS ONE* 2014; 6(6): e21362 doi:10.1371/journal.pone.0021362.

Kappor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A Newly Identified Bocavirus Species in Human Stool. *J. Infect. Dis.* 2009; 199:196-200.

Karalar L, Lindner J, Schimanski S, Kertai M, Sergerer H, Modrow S. Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin Microbiol Infect* 2009; 16: 633-639.

Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: Molecular Epidemiological Profil and Clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *Jour Infect Diseases* 2006; 194: 1276-82.

Khalfaoui S, Eichhorn V, Karagiannidis C, Bayh I, Brookmann M, Pieper M, et al. Lung Infection by human bocavirus induces the release of profibrotic mediator cytokines in vivo and in vitro. PLoS ONE 2016 11(1): e0147010 doi:10.1371/journal.pone.0147010.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequence. Briefings in Bioinformatics 2008; 9(4): 299-306.

Lau SK, Yip CCY, Que T-I, Lee RA, Au-Yeung RKH, Zhou B, et al. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. J Infect Diseases 2007; 196: 986-93.

Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiro H, Ariga T, et al. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. J Clin Microb 2006; 44: 1132-1134.

Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. J Clin Virol 2007; 38: 321-325.

Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological Profile and clinical associations of human bocavirus and Other human Parvovirus. J Infect Diseases 2006; 194: 1283-90.

Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence and molecular epidemiology of parvovirus B19 and a novel human parvovirus PARV 4 and human bocavirus. J Infect Diseases 2007; 195: 1345-1552.

Naghipour M, Cuervas LE, Bakhshinejad T, Dove W, Hart CA. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections. J Med Virology 2007; 79(5): 539-43.

Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, et al. Real-Time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and Phylogenetic analysis. J Clin Microbiol 2007; 45(7): 2116-2122.

Pozo F, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Cuesta I, Perez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virology* 2007; 40(3): 224-8.

Proença-Modena JL, Gagliardi TB, Paula FE, Iwamoto MA, Criado MF, Camara AA, et al. Detection of human bocavirus mRNA in Concurrent Diarrhea. *PLoS ONE* 2011; 6(6): e21083 doi: 10.1371/journal.pone.0021083.

Sanjay T e Kramer FR. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology*.1996; 14: 303-308. Doi: 10.1038/nbt0396-303.

Santos N, Peret TCT, Humphrey CD, Albuquerque MCM, Silva RC, Benati F, et al. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J Clin Virology* 2010; 48: 127-130.

Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or Pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Reviews* 2008; 291-304.

Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Diseases* 2006; 12: 1457-1458.

Söderlund-Venermo M, Lahtinen A, Jartti T, Hedman L, Kempainen K, Lehtinen O, et al. Clinical assessment and improved diagnosis of bocavirus-induced wheezing in children, Finland. *Emerg Infect Diseases* 2009; 15(9): 1423-30.

Souza EL, Ramos JG, Proença-Modena JL, Diniz A, Carvalho G, Ciuffo I, et al. Human bocavirus in very Young infants hospitalized with acute respiratory infection in Northeast Brazil. *J Tropical Pediatric* 2010; 56(2): 125-127.

Tabasi M, Mokhtari-Azad T, Eshraghian MR, Shadab A, Shatizadeh S, Shafiei-Jandaghi NZ, et al. Human bocavirus infections among children less than two years old in Iran during fall and winter 2012-2013. *Iranian Jour Microb* 2016; 8(1): 80-84.

Tyumentsev AI, Tikunova NV, Tikunov AY, Babkin IV. Recombination in the evolution of human bocavirus. *Infect Gene and Evolution* 2014; 28: 11-14.

Vallet C, Pons-Catalano C, Mandelewajg A, Wang A, Raymond J, Lebon P, et al. Human bocavirus: A cause of severe asthma exacerbation in children. *J Pediatric* 2009; 155: 286-8.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Diseases* 2007; 13(4): 636-637.

Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Diseases* 2006; 6: 109.

Xiaoyan L, Chittaganpitch M, Olsen SJ, et al. Real-Time PCR Assays for Detection of Bocavirus in Human Specimens. *J. Clin. Microbiology*. 2006. 44(9): 3231-3235.

Zhi N, Mills I, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown K. Molecular and functional analysis of a Human Parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virology* 2006; 80(12): 5941-5950.

8. Anexos



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepial@ial.sp.gov.br



São Paulo, 16 de setembro de 2011.

Protocolo: **048/2011**
Registro CEPIAL nº 016/2011 de 28/07/11
1º Parecer - Protocolo 043/2011 de 22/08/11

Projeto de Pesquisa: “Detecção e análise filogenética do bocavírus humano em crianças com infecção respiratória aguda no ano de 2010 em São Paulo, Brasil”.

Pesquisador Responsável: Maria Isabel de Oliveira

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião ordinária de 15 de setembro de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador
2ª via - CEPIAL

9. Apêndice

ID	D_NASC	IDADE	SEXO	D_IN SINT	D_COLET	PROCED	IFI	FEBRE	TOSSE	DOR DE GARGANTA	DOR MUSACULAR	Dor de Cabeça	ARTRALGIA	CORIZA	DOR DE OUVIDO	OBSTRUÇÃO NASAL	PCR_BOCA	CT
1	22/06/2005	4 A.	F	03/01/2010	06/01/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
2	12/01/2005	5 A.	M	06/01/2010	06/01/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
3	13/01/2009	1 A.	F	03/01/2010	07/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
4	01/07/2009	6 M.	M	17/01/2010	21/01/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
5	24/01/2008	2 A.	M	19/01/2010	21/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
6	12/08/2008	2 A.	M	18/01/2010	21/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
7	22/07/2009	6 M.	M	19/01/2010	21/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
8	01/11/2008	1 A.	F	17/01/2010	21/01/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
9	28/03/2006	3 A.	F	19/01/2010	21/01/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
10	24/05/2008	1 A.	F	19/01/2010	21/01/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
11	03/01/2010	25 D.	M	25/01/2010	28/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
12	29/06/2006	4 A.	F	22/01/2010	28/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
13	01/08/2009	5 M.	M	24/01/2010	28/01/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
14	07/07/2006	4 A.	F	25/01/2010	28/01/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
15	14/01/2009	1 A.	M	31/01/2010	03/02/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
16	16/01/2008	2 A.	M	01/02/2010	04/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-

17	23/09/2009	5 M.	F	08/02/2010	11/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
18	08/10/2008	2 A.	F	09/02/2010	11/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
19	17/02/2008	2 A.	M	08/02/2010	11/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	NÃO	NEGATIVO	-							
20	04/03/2008	2 A.	M	17/02/2010	18/02/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
21	21/05/2009	9 M.	F	16/02/2010	18/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
22	02/09/2006	4 A.	M	15/02/2010	18/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	35.36
23	25/09/2007	2 A.	F	22/02/2010	24/02/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
24	15/10/2009	4 M.	F	21/02/2010	24/02/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
25	22/03/2006	4 A.	F	22/02/2010	24/02/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
26	04/12/2006	4 A.	M	23/02/2010	25/02/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
27	02/06/2009	9 M.	M	01/03/2010	02/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
28	18/11/2006	3 A.	F	28/02/2010	02/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
29	15/09/2007	2 A.	M	27/02/2010	02/03/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
30	13/07/2007	3 A.	M	01/03/2010	04/03/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
31	28/06/2009	9 M.	F	02/03/2010	04/03/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	22.77
32	23/03/2005	5 A.	F	02/03/2010	04/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	POSITIVO	37.41						
33	23/05/2007	3 A.	F	02/03/2010	04/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
34	21/09/2005	5 A.	M	01/03/2010	04/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
35	10/01/2009	1 A.	F	01/03/2010	04/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-

36	22/08/2006	3 A.	F	06/03/2010	09/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	NEGATIVO	-									
37	07/09/2009	6 M.	M	07/03/2010	09/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVO	-							
38	07/09/2007	2 A.	F	07/03/2010	09/03/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-							
39	13/08/2009	7 M.	M	07/03/2010	11/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	NEGATIVO	-
40	25/10/2008	2 A.	F	07/03/2010	11/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	NEGATIVO	-
41	20/03/2007	3 A.	M	07/03/2010	11/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
42	14/11/200	4 M.	F	09/03/2010	11/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	NEGATIVO	-
43	25/03/2009	1 A.	M	11/03/2010	11/03/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	POSITIVO	23.22
44	10/11/2006	4 A.	F	13/03/2010	16/03/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
45	01/02/2010	1 M.	F	14/03/2010	16/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
46	07/02/2009	1 A.	M	22/03/2010	24/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
47	28/06/2007	2 A.	F	21/03/2010	24/03/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-						
48	18/06/2009	9 M.	M	23/03/2010	24/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	NEGATIVO	-
49	01/07/2009	8 M.	M	22/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
50	02/02/2009	1 A.	M	23/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
51	11/08/2009	7 M.	F	20/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
52	02/03/2005	5 A.	F	24/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
53	19/08/2009	7 M.	F	23/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
54	24/08/2007	3 A.	M	20/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-

55	04/04/2005	5 A.	F	23/03/2010	25/03/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
56	24/08/2009	7 M.	M	24/03/2010	25/03/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
57	16/03/2010	15 D.	F	28/03/2010	31/03/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
58	20/04/2009	1 A.	F	31/03/2010	01/04/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	POSITIVO	23.61
59	12/10/2008	2 A.	M	30/03/2010	01/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
60	20/07/2007	3 A.	F	07/04/2010	08/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
61	18/06/2004	5 A.	F	05/04/2010	08/04/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
62	12/11/2009	5 M.	M	08/04/2010	08/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
63	15/07/2008	2 A.	F	06/04/2010	08/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
64	26/08/2009	8 M.	F	07/04/2010	08/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
65	27/08/2009	8 M.	F	06/04/2010	08/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
66	11/08/2009	8 M.	F	06/04/2010	08/04/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
67	09/01/2006	4 A.	M	12/04/2010	15/04/2010	H.V.M	NEG	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
68	25/05/2009	11 M.	M	13/04/2010	15/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	POSITIVO	38.83
69	07/01/2006	4 A.	M	10/04/2010	15/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
70	21/06/2008	2 A.	M	11/04/2010	15/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
71	01/03/2007	3 A.	F	10/04/2010	15/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
72	11/02/2006	4 A.	M	14/04/2010	15/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
73	20/08/2009	8 M.	F	14/04/2010	15/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	39.48

74	11/08/2007	3 A.	F	12/04/2010	15/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
75	21/08/2008	2 A.	M	13/04/2010	15/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	38.7
76	04/11/2006	4 A.	M	19/04/2010	22/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	POSITIVO	38.18
77	01/03/2008	2 A.	F	20/04/2010	22/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	37.93
78	01/04/2005	5 A.	F	20/04/2010	22/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NEGATIVO	-
79	02/07/2009	9 M.	F	20/04/2010	22/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	21.14
80	14/02/2005	5 A.	M	18/04/2010	22/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
81	31/07/2009	9 M.	M	19/04/2010	22/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
82	22/07/2004	5 A.	M	19/04/2010	22/04/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
83	04/08/2009	8 M.	F	27/04/2010	29/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
84	06/10/2007	3 A.	M	27/04/2010	29/04/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	30.77
85	12/05/2009	11 M.	M	27/04/2010	29/04/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
86	29/05/2006	4 A.	M	04/05/2010	06/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	15.34
87	08/09/2009	8 M.	F	02/05/2010	06/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	36-07
88	12/03/2010	1 M.	M	03/05/2010	06/05/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
89	18/07/2007	3 A.	F	09/05/2010	13/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	34.92
90	13/11/2009	6 M.	F	11/05/2010	13/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	25.77
91	10/04/2010	1 M.	F	10/05/2010	13/05/2010	H.V.M	NEG	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
92	01/09/2010	4 M.	M	10/05/2010	13/05/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-

93	09/03/2008	2 A.	M	17/05/2010	20/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
94	17/05/2008	2 A.	M	16/05/2010	20/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
95	21/07/2009	10 M.	F	18/05/2010	20/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
96	02/04/2009	1 A.	M	19/05/2010	20/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	32.75
97	10/05/2008	2 A.	M	17/05/2010	20/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-
98	15/06/2009	11 M.	M	17/05/2010	20/05/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	20.68
99	12/10/2008	1 A.	F	17/05/2010	20/05/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
100	07/03/2009	1 A.	M	26/05/2010	27/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	35.81
101	21/03/2004	5 A.	F	26/05/2010	27/05/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
102	04/06/2007	3 A.	F	22/05/2010	27/05/2010	H.V.M	NEG	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
103	13/11/2008	2 A.	F	25/05/2010	27/05/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	34.96
104	21/03/2006	4 A.	M	25/05/2010	27/05/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
105	17/03/2010	2 M.	F	24/05/2010	27/05/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
106	16/11/2009	6 M.	F	25/05/2010	27/05/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
107	14/03/2009	1 A.	M	23/05/2010	27/05/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
108	03/05/2007	3 A.	M	31/05/2010	01/06/2010	H.G.G	NEG	NÃO	NEGATIVO	-								
109	17/05/2009	1 A.	F	30/05/2010	01/06/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
110	09/06/2009	1 A.	M	31/05/2010	02/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
111	17/04/2005	5 A.	M	30/05/2010	02/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-

112	17/07/2009	11 M.	M	31/05/2010	02/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
113	20/09/2007	3 A.	M	31/05/2010	02/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
114	29/01/2009	1 A.	M	30/05/2010	04/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
115	19/06/2009	1 A.	M	01/06/2010	04/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
116	17/05/2005	5 A.	F	31/05/2010	04/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
117	06/02/2010	4 M.	M	06/06/2010	09/06/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
118	10/09/2005	4 A.	F	06/06/2010	09/06/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
119	08/10/2009	8 M.	M	06/06/2010	09/06/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
120	19/01/2010	5 M.	F	07/06/2010	10/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
121	02/05/2008	2 A.	M	08/06/2010	10/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	41.67
122	11/06/2008	2 A.	M	07/06/2010	10/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
123	10/06/2008	2 A.	F	06/06/2010	10/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NEGATIVO	-
124	13/07/2009	1 A.	M	13/06/2010	17/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
125	04/04/2009	1 A.	F	16/06/2010	17/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	41.86
126	16/02/2009	1 A.	F	15/06/2010	17/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
127	29/03/2008	2 A.	M	15/06/2010	17/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
128	11/05/2007	3 A.	F	14/06/2010	17/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
129	03/08/2009	10 M.	F	14/06/2010	17/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
130	04/05/2007	3 A.	M	13/06/2010	17/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-

131	09/03/2008	2 A.	F	14/06/2010	17/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	POSITIVO	41.07
132	28/08/2006	3.A	M	15/06/2010	17/06/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
133	16/11/2009	11 M.	F	16/06/2010	17/06/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
134	04/10/2009	8 M.	F	02/06/2010	17/06/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
135	10/05/2010	1 M.	M	22/06/2010	24/06/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
136	13/09/2006	4 A.	F	21/06/2010	24/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
137	21/04/2010	2 M.	M	21/06/2010	24/06/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
138	08/06/2006	4 A.	F	28/06/2010	01/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
139	19/05/2008	2 A.	F	26/06/2010	30/06/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
140	30/07/2006	4 A.	M	06/07/2010	07/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
141	05/07/2006	4 A.	F	06/07/2010	08/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
142	02/11/2009	8 M.	M	07/07/2010	08/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	POSITIVO	41.28
143	04/04/2010	3 M.	M	05/07/2010	08/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
144	10/11/2005	5 A.	M	05/07/2010	08/07/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
145	26/12/2008	2 A.	F	06/07/2010	08/07/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
146	22/02/2009	1 A.	M	04/07/2010	08/07/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
147	31/08/2009	11 M.	M	04/07/2010	07/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
148	16/11/2006	4 A.	F	03/07/2010	07/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
149	12/05/2010	2 M.	M	05/07/2010	07/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-

150	01/11/2006	4 A.	F	13/07/2010	14/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
151	29/06/2006	4 A.	F	13/07/2010	14/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
152	29/09/2008	10 M.	M	13/07/2010	14/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
153	15/02/2006	4 A.	M	12/07/2010	14/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
154	12/11/2008	2 A.	M	11/07/2010	14/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
155	22/02/2006	4 A.	F	14/07/2010	15/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
156	06/07/2009	1 A.	M	12/07/2010	15/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
157	15/04/2007	3 A.	M	12/07/2010	15/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
158	04/10/2004	5 A.	M	15/07/2010	15/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
159	24/03/2010	4 M.	F	12/07/2010	15/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
160	10/08/2009	1 A.	M	13/07/2010	15/07/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	37.93
161	19/04/2009	1 A.	F	20/07/2010	21/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
162	11/08/2008	11 M.	F	19/07/2010	21/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
163	05/04/2006	4 A.	M	19/07/2010	21/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	37.20
164	26/06/2008	2 A.	M	19/07/2010	21/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
165	10/04/2010	3 M.	M	19/07/2010	21/07/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
166	28/09/2009	10 M.	F	19/07/2010	21/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
167	07/02/2010	5 M.	M	19/07/2010	22/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
168	19/10/2008	1 A.	M	21/07/2010	23/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	POSITIVO	37.65						

169	09/06/2009	1 A.	M	26/07/2010	28/07/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
170	25/03/2010	4 M.	M	23/07/2010	28/07/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
171	06/05/2007	3 A.	M	24/07/2010	28/07/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
172	09/05/2010	2 M.	M	25/07/2010	28/07/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
173	26/02/2010	5 M.	F	27/07/2010	29/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
174	02/01/2010	5 M.	M	26/07/2010	29/07/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
175	17/06/2008	2 A.	F	27/07/2010	29/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
176	05/06/2010	1 M.	F	27/07/2010	29/07/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
177	04/03/2010	4 M.	F	01/08/2010	03/08/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
178	05/06/2006	4 A.	M	01/08/2010	03/08/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
179	07/01/2010	6 M.	F	02/08/2010	03/08/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	NEGATIVO	-
180	17/05/2006	4 A.	M	02/01/2010	04/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
181	20/12/2005	5 A.	M	03/08/2010	04/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
182	03/02/2010	6 M.	F	01/08/2010	04/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
183	29/10/2008	2 A.	M	01/08/2010	04/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
184	15/12/2008	2 A.	M	04/08/2010	05/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
185	17/11/2005	4 A.	F	09/08/2010	12/08/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
186	17/12/2009	8 M.	F	08/08/2010	12/08/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
187	21/01/2010	7 M.	F	07/08/2010	12/08/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						

188	02/04/2008	2 A.	F	10/08/2010	12/08/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
189	27/11/2009	10 M.	M	10/08/2010	12/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
190	24/12/2005	5 A.	M	11/08/2010	12/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NEGATIVO	-
191	15/11/2009	9 M.	M	17/08/2010	19/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
192	09/06/2009	1 A.	M	17/08/2010	19/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
193	31/12/2006	4 A.	F	17/08/2010	19/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
194	31/07/2009	11 M.	F	15/08/2010	19/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
195	11/02/2010	8 M.	M	15/08/2010	19/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
196	05/01/2010	7 M.	M	15/08/2010	19/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
197	15/07/2009	1 A.	M	17/08/2010	19/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
198	08/10/2006	4 A.	M	18/08/2010	19/08/2010	H.V.M	NEG	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	NEGATIVO	-
199	20/07/2010	1 M.	F	18/08/2010	19/08/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
200	22/12/2009	1 A.	F	17/08/2010	19/08/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	40.21
201	05/12/2009	8 M.	F	25/08/2010	26/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	36.55
202	01/11/2006	4 A.	F	25/08/2010	26/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
203	01/12/2009	8 M.	F	22/08/2010	26/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
204	01/12/2009	8 M.	M	25/08/2010	26/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
205	30/01/2007	3 A.	M	23/08/2010	26/08/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
206	16/06/2008	2 A.	F	23/08/2010	26/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-

207	05/06/2010	2 M.	F	28/08/2010	31/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	36.24
208	10/06/2010	2 M.	F	29/08/2010	31/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	35.49
209	09/04/2009	1 A.	M	29/08/2010	31/08/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
210	24/10/2009	1 A.	F	31/08/2010	02/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	38.01
211	06/05/2009	1 A.	F	30/08/2010	02/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
212	09/01/2009	1 A.	M	30/08/2010	02/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	37.75
213	17/06/2009	1 A.	M	01/09/2010	02/09/2010	H.V.M	NEG	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
214	05/04/2010	5 M.	M	30/08/2010	02/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	38.64
215	11/06/2010	3 M.	F	29/08/2010	02/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	37.72
216	02/04/2009	1 A.	M	08/09/2010	09/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
217	13/08/2009	1 A.	F	07/09/2010	09/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	NEGATIVO	-
218	29/08/2005	5 A.	F	10/09/2010	14/09/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
219	30/01/2006	4 A.	F	08/09/2010	14/09/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-
220	27/08/2009	1 A.	M	11/09/2010	15/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	19.36
221	20/10/2005	5 A.	M	12/09/2010	16/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
222	22/06/2009	1 A.	F	13/09/2010	16/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	39.14
223	10/07/2009	1 A.	F	13/09/2010	16/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	POSITIVO	36.52
224	13/02/2006	4 A.	F	13/09/2010	16/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
225	21/06/2010	3 M.	F	18/09/2010	22/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-

226	14/05/2010	4 M.	M	20/09/2010	23/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
227	11/08/2007	3 A.	M	22/09/2010	23/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
228	26/09/2010	1 A.	F	22/09/2010	23/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	POSITIVO	43.37
229	21/05/2006	4 A.	M	19/09/2010	23/09/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
230	12/12/2008	1 A.	F	21/09/2010	28/09/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVO	-						
231	13/03/2010	6 M.	M	26/09/2010	28/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
232	28/06/2010	3 M.	M	26/09/2010	30/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
233	24/04/2010	5 M.	F	26/09/2010	30/09/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
234	14/01/2010	8 M.	M	29/09/2010	29/09/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
235	04/06/2010	3 M.	F	26/09/2010	29/09/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NEGATIVO	-
236	14/10/2005	4 A.	M	26/09/2010	29/09/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
237	23/06/2010	3 M.	M	25/09/2010	06/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
238	20/10/2009	1 A.	F	03/10/2010	06/10/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
239	09/02/2009	1 A.	F	05/10/2010	06/10/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
240	30/12/2004	5 A.	F	05/10/2010	07/10/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
241	04/01/2009	1 A.	F	05/10/2010	07/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	40.29
242	05/04/2006	4 A.	F	05/10/2010	13/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
243	26/05/2007	3 A.	M	10/10/2010	06/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
244	12/07/2010	3 M.	M	03/10/2010	13/10/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-

245	15/12/2008	2 A.	M	11/10/2010	13/10/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
246	15/02/2007	3 A.	M	11/10/2010	13/10/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	31.51
247	18/03/2008	2 A.	F	10/10/2010	13/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-						
248	17/08/2010	1 M.	M	11/10/2010	13/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	33.79						
249	13/03/2010	6 M.	M	10/10/2010	13/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	37.09
250	06/11/2009	11 M.	M	12/10/2010	13/10/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVO	-
251	23/05/2010	4 M.	M	10/10/2010	20/10/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
252	16/05/2010	5 M.	M	19/10/2010	20/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
253	27/12/2005	5 A.	F	19/10/2010	28/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
254	01/03/2006	4 A.	F	27/10/2010	20/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	22.01
255	01/03/2010	7 M.	M	17/10/2010	20/10/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
256	08/10/2006	4 A.	M	18/10/2010	20/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	38.11
257	16/11/2004	5 A.	M	17/10/2010	28/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
258	01/03/2006	4 A.	F	27/10/2010	28/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
259	30/09/2005	5 A.	M	27/10/2010	28/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
260	25/02/2010	8 M.	F	26/10/2010	27/10/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	POSITIVO	39.19
261	25/03/2010	7 M.	F	24/10/2010	27/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
262	13/08/2009	1 A.	F	25/10/2010	27/10/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
263	11/01/2009	1 A.	M	25/10/2010	27/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-						

264	01/03/2010	7 M.	M	24/10/2010	03/11/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
265	02/11/2006	4 A.	F	01/11/2010	03/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
266	03/03/2009	1 A.	M	02/11/2010	03/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
267	21/11/2006	4 A.	M	01/11/2010	03/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
268	06/09/2010	2 M.	M	01/11/2010	04/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
269	22/09/2008	2 A.	F	01/11/2010	11/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
270	26/02/2006	4 A.	M	10/11/2010	03/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
271	18/03/2010	7 M.	F	31/10/2010	03/10/2010	H.G.G	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
272	03/10/2009	1 A.	M	01/11/2010	09/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
273	04/10/2007	3 A.	F	08/11/2010	09/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
274	19/01/2009	1 A.	M	07/11/2010	10/11/2010	H.G.G	NEG	SIM	NÃO	NEGATIVO	-							
275	16/09/2009	1 A.	M	08/11/2010	10/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
276	18/09/2007	3 A.	F	07/11/2010	10/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
277	12/06/2006	4 A.	M	08/11/2010	11/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
278	26/02/2006	4 A.	M	10/11/2010	11/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
279	22/01/2010	10 M.	F	08/11/2010	11/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	POSITIVO	39.99
280	22/02/2010	9 M	M	10/11/2010	11/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
281	29/06/2006	4 A.	F	15/11/2010	17/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
282	23/11/2009	1 A.	F	15/11/2010	17/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-

283	25/10/2009	1 A.	M	14/11/2010	17/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NJAO	SIM	POSITIVO	24.25
284	08/02/2005	5 A.	F	16/11/2010	18/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
285	04/05/2009	1 A.	M	16/11/2010	18/11/2010	H.V.M	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
286	14/03/2009	1 A.	M	13/11/2010	17/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
287	16/06/2010	5 M.	F	14/11/2010	18/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
288	08/07/2010	4 M.	F	13/11/2010	18/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
289	29/08/2010	3 M.	M	16/11/2010	17/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
290	05/05/2010	6 M.	M	18/11/2010	19/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
291	31/03/2010	8 M.	M	22/11/2010	24/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
292	25/10/2009	1 A.	M	21/11/2010	24/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	POSITIVO	28.76
293	30/04/2010	7 M.	M	20/11/2010	24/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
294	05/05/2010	6 M.	M	20/11/2010	24/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
295	14/06/2008	2 A.	F	20/11/2010	24/11/2010	H.M.I.M.J	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-
296	24/02/2009	1 A.	M	22/11/2010	24/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
297	07/10/2010	1 M.	M	21/11/2010	24/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
298	22/09/2008	2 A.	M	20/11/2010	24/11/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
299	10/10/2010	1 M.	M	22/11/2010	24/11/2010	H.G.G.	NEG	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVO	-
300	20/01/2010	10 M.	F	29/11/2010	01/12/2010	H.G.G	NEG	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVO	-

